

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



TESIS DOCTORAL

**Caracterización de las factorías virales y complejos replicativos ensamblados
por virus ARN**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Isabel Fernández de Castro Martín

Directora

Cristina Risco Ortiz

Madrid, 2014



**Universidad Complutense de Madrid
Departamento de Genética
Facultad de Ciencias Biológicas**

**Caracterización de las factorías virales y
complejos replicativos ensamblados por virus
ARN**

Tesis Doctoral

**Isabel Fernández de Castro Martín
Madrid, 2014**





Universidad Complutense de Madrid
Departamento de Genética
Facultad de Ciencias Biológicas

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por:

Isabel Fernández de Castro Martín

Directora de Tesis:
Cristina Risco Ortiz

Madrid, 2014



Este trabajo ha sido realizado en el Laboratorio de Estructura Celular del Departamento de Estructura de Macromoléculas del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) con una beca de Formación de Personal Investigador (FPI).

En primer lugar me gustaría agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Cristina Risco Ortiz, por darme la oportunidad de realizar la tesis en su laboratorio. Muchísimas gracias también por todas las cosas que me ha enseñado durante todos estos años, por la confianza y por la rápida corrección de este manuscrito.

Gracias a los compañeros del laboratorio de Estructura Celular que he tenido durante estos años y que se han esforzado en ayudarme y enseñarme.

Parte del material usado en esta tesis doctoral fue generado durante una estancia en el laboratorio del Dr. Peter Nagy (Universidad de Lexington). Muchas gracias a Peter y a toda la gente de su laboratorio, por darme la oportunidad de trabajar allí durante tres meses. En especial muchas gracias al Dr. Daniel Barajas, por enseñarme las técnicas de Biología Molecular aplicadas en esta tesis y por ayudarme tanto, en todos los sentidos, durante la estancia. Muchos de los anticuerpos y herramientas usadas para el estudio del virus Bunyamwera se generaron en el laboratorio del Dr. Richard Elliott (Universidad de St Andrews) muchas gracias a Richard y a la Dra. Noelia López por los plásmidos que generó en su laboratorio, algunos usados en este trabajo. También me gustaría agradecer al Dr. Terence S. Dermody (Universidad de Vanderbilt) por el material de reovirus generado en su laboratorio y utilizado en esta tesis doctoral.

Muchas gracias a todos los servicios del CNB, en especial al servicio de Microscopía Electrónica (Cristina Patiño, Javier Bueno, Rocío San Andrés y Ana Beloso) y al servicio de Microscopía Confocal (Dra. Sylvia Gutiérrez y Susana Hernández) por su apoyo y consejos durante la tesis. También querría agradecer al Dr. José Jesús Fernández por enseñarme el manejo de programas para hacer las reconstrucciones tridimensionales y a la Dra. Carmen López Iglesias por enseñarme los inicios de la tomografía. Gracias al Dr. José Antonio Tercero por enseñarme las técnicas básicas para el cultivo de levaduras y por cederme reactivos usados en esta tesis.

Muchas gracias a mi familia, mis hermanos Miguel y Alicia, mis sobrinos Javi, Luci, Agus e Isa, mi cuñado Agustín, mis tías Elena y Alicia, mi abuela María Josefa, mi padre Miguel y por supuesto mi novio Javier, por su apoyo incondicional. Gracias también a María y Sara por su amistad.

Muchísimas gracias a mi madre María José, por tantísimas cosas...

Muchas gracias a todos

A mi madre, María José

†16-4-2009

Índice

Índice	i
Abreviaturas	ix
Resumen	1
Introducción	7
1. Replicación viral: factorías virales.....	9
2. Arquitectura de los complejos replicativos (CRs)	12
3. <i>Tomato bushy stunt virus</i>	18
3.1. Morfología y genoma viral.....	18
3.2. Proteínas virales	20
3.3. Ciclo de replicación viral	21
3.4. Las levaduras como modelo para el estudio de tombusvirus	24
3.5. Proteínas celulares implicadas en el ensamblaje del CR de tombusvirus y en replicación viral.....	24
4. Virus Bunyamwera	28
4.1. Morfología y genoma viral.....	29
4.2. Proteínas virales	30
4.3. Ciclo de replicación viral	32
4.4. Ensamblaje y morfogénesis viral	35
4.5. Proteínas celulares implicadas en reclutamiento de orgánulos y transporte de RNPs	38
5. Reovirus	41
5.1. Morfología viral	41
5.2. Genoma y proteínas virales	42
5.3. Ciclo de replicación viral	43
5.4. Ensamblaje de inclusiones virales.....	45
6. Nuevos métodos de microscopía para el estudio de las infecciones virales. Metalotioneína como marcador clonable para MET.....	47
Objetivos	55
Materiales y Métodos	59
1. Materiales.....	61

1.1. Células y virus.....	61
1.2. Anticuerpos y sondas	62
1.3. Otros reactivos.....	63
2. Bioquímica.....	64
2.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS) ..	64
2.2. Inmunotransferencia e inmunodetección (<i>western blot</i>)	64
3. Biología molecular.....	65
3.1. Generación de plásmidos que expresan los elementos necesarios para la replicación de tobusvirus	65
3.2. Transformación de células de levadura.....	68
3.3. Extracción de ARN total de levaduras y de plantas	68
4. Biología celular y Virología.....	69
4.1. Obtención de esferoplastos.....	69
4.2. Infección de plantas <i>Nicotiana benthamiana</i> con TBSV y tratamiento con citocalasina-D	70
4.3. Cultivo de células de mamífero.....	71
4.4. Infección de células de mamífero con VBUN	71
4.5. Propagación del stock original de VBUN en células de mamífero.....	71
4.6. Titulación viral	72
4.7. Purificación de VBUN extracelulares	72
4.8. Tratamiento con drogas.....	73
4.9. Transfección de células de mamífero.....	74
4.10. Ensayo de incorporación de análogos de nucleótido (BrU).....	75
4.11. Tratamiento con oro y METTEM	75
5. Microscopía óptica.....	76
5.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	76
6. Microscopía electrónica de transmisión.....	77
6.1. Inclusión para el estudio de la ultraestructura.....	77
6.2. Inclusión de muestras para inmunomarcaje	79
6.3. Obtención de secciones ultrafinas	80

6.4. Inmunomarcaje con anticuerpos.....	81
6.5. Marcadores de referencia para tomografía electrónica	82
6.6. Tinción de muestras de microscopía electrónica.....	82
7. Procesamiento de imágenes y reconstrucción 3D.....	83
Resultados.....	87
1. <i>Tomato bushy stunt virus</i>	89
1.1. Replicación viral y expresión de proteínas virales en levadura	89
1.2. Estudio del CR de TBSV en células de levadura que expresan proteínas y ARN viral.....	90
1.3. Caracterización del mutante ESCRT $\Delta vps4$	97
1.3.1. Colocalización de la proteína Vps4 con dsRNA en el CR de TBSV	97
1.3.2. Función de la proteína Vps4 en el ensamblaje del CR de tombusvirus	102
1.4. Papel de otras proteínas ESCRT en ensamblaje del CR de tombusvirus.....	104
1.5. Estudio del CR de TBSV en células de levadura donde el gen <i>pah1</i> ha sido deletado	107
1.5.1. La ultraestructura cambia considerablemente en levaduras $\Delta pah1$	107
1.5.2. Modelo 3D del CR de tombusvirus en levaduras $\Delta pah1$	108
1.5.3. Localización de la replicasa viral mediante METTEM en levaduras $\Delta pah1$	110
1.5.4. En levaduras $\Delta pah1$ el RE es un elemento clave en el ensamblaje del CR y en replicación viral.....	113
1.5.5. Modelo 3D de la organización de las moléculas de replicasa viral	117
1.6. Actina y replicación de tombusvirus en plantas y levaduras	121
1.6.1. La eliminación de actina provoca un incremento en la replicación de TBSV	121
1.6.2. Esférulas de TBSV en <i>Nicotiana Benthamiana</i> tratadas con citocalasina-D.....	123
1.6.3. Acumulación de membranas en levaduras tratadas con citocalasina-D.....	125
2. Virus Bunyamwera	127
2.1. Estudio de la factoría viral en células Vero.....	127
2.2. Estudio ultraestructural del CR de VBUN con la técnica METTEM	131
2.3. Proteínas celulares implicadas en la infección viral.....	135
2.3.1. Proteínas mitocondriales	135
2.3.2. Miosina-9	139

2.4. Estudio estructural de virus purificados	142
3. Reovirus	146
3.1. Estudio de las inclusiones formadas por reovirus mediante MET	146
Discusión	153
1. Tombusvirus	155
1.1. Caracterización del complejo replicativo de tombusvirus	155
1.2. La proteína Vps4 es requerida para el correcto ensamblaje del CR de tombusvirus en levaduras.....	158
1.3. El CR de tombusvirus en células de levadura que carecen de la proteína Pah1	163
1.4. Influencia del citoesqueleto en la replicación de tombusvirus.....	166
2. Bunyavirus	169
2.1. Ensamblaje del CR de virus Bunyamwera en células de mamífero.....	169
2.2. P32, Mfn-2 y miosina-9 en la factoría del VBUN	172
2.3. Estructura del producto final de la factoría: los virus infectivos.....	175
3. Reovirus	177
3.1. Presencia de membranas en las inclusiones formadas por reovirus.....	177
Conclusiones	183
Bibliografía	189
Anexos	211

Abreviaturas

AANE	Aminoácidos no esenciales
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ATP	Adenosín trifosfato
Ad5	Adenovirus de tipo 5
ARN	Ácido ribonucleico
ARNc	ARN complementario
dsRNA	ARN de doble hélice (<i>double stranded</i>)
ARNi	ARN interferente
ARNm	ARN mensajero
ARNm sg	ARNm subgenómico
ssRNA (+)	ARN de cadena sencilla (<i>single stranded</i>) y polaridad positiva
ssRNA (-)	ARN de cadena sencilla y polaridad negativa
ARNv	ARN viral
ASFV	<i>African swine fever virus</i>
BHK-21	<i>Baby hamster kidney cells</i>
BMV	<i>Brome mosaic virus</i>
BrEt	Bromuro de etidio
BrU	Bromo uridina
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>bovine serum albumin</i>)
CCHFV	<i>Crimean-Congo hemorrhagic fever virus</i>
CNV	<i>Cucumber necrosis virus</i>
COMT	Centro organizador de microtúbulos
CP	Proteína de la cápsida
CPV	Vacuola citopática (<i>cytopathic vacuole</i>)
CR	Complejo replicativo

3D Tres dimensiones

DAG Diacilglicerol

DAPI Diclorato de 4', 6-diamidino-2-fenilindol

DMEM *Dulbecco's modified eagle's medium*

DMSO Dimetilsulfóxido

dNTPs Desoxirribonucleótidos trifosfato

DO Densidad óptica

dpi días post-infección

DTT Ditioneitol

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético

eEF1 α Factor de elongación 1 α

EGTA Ácido etilenglicol-bis-(2-aminoetil)-tetraacético

ERGIC *Endoplasmic Reticulum Golgi Intermediate Compartment*

ESCRT *Endosomal sorting complex required for transport*

FASN Ácido graso sintasa

FBS Suero fetal bovino

FHV *Flock house virus*

GA Glutaraldehído

GAPDH Enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GFP Proteína fluorescente verde

HA hemaglutinina

HEPES Ácido N-2-hidroxietilpiperacín-N'-2-etanosulfónico

His histidina

hpi horas post-infección

hpt horas post-transfección

Hsp70 *Heat shock protein 70*

IFI Inmunofluorescencia indirecta

IFN Interferón

IRES *Internal ribosome entry site*

ISVPs *Infected subviral particles*

JAM-A *Junctional adhesion molecule-A*

LACV *La Crosse encephalitis virus*

LAFV *Lassa fever virus*

LD *Lipid droplets*

MAVS *Mitochondrial antiviral signaling*

MDCK *Madin-Darby canine kidney*

MET Microscopía electrónica de transmisión

METTEM *Metal-tagging transmission electron microscopy*

Mfn-2 Mitofusina-2

MT Metalotioneína

MVB *Multivesicular body*

NMHC-IIA *Non muscle myosin II-A heavy chain*

NPs Nucleoproteínas

o/n *Over night*

ORFs *Open reading frames*

PA ácido fosfatídico

PABP *Poly A binding protein*

PAG *Protein A-gold*

PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida

PBS Tampón fosfato salino

PC Fosfatidilcolina

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

PDI Proteína disulfuro isomerasa

PE Fosfatidiletanolamina

PFA Paraformaldehído
PI4-quinasa Fosfatidil inositol 4 quinasa
PM Proteínas de movimiento
PML-NBs *Promyelocytic leukemia nuclear bodies*
RE Retículo endoplasmático
RER Retículo endoplasmático rugoso
RNPs Ribonucleoproteínas
RT Temperatura ambiente (*room temperature*)
SA α -Linked sialic acid
SARS Síndrome respiratorio agudo y severo
SC Suero de cabra
SDS Duodecil sulfato sódico
SF2 Factor de *splicing* 2 (*splicing factor* 2)
SFV *Semliki forest virus*
SNC Sistema nervioso central
SV-40 *Simian virus 40*
TAG Triacilglicéridos
TBSV *Tomato bushy stunt virus*
TIP47 *Tail-interacting protein 47*
TM Transmembrana
TMV *Tobacco mosaic virus*
TuMV *Turnip mosaic virus*
TYMV *Turnip yellow mosaic virus*
Ub Ubiquitina
UFP Unidades formadoras de placa
UV Ultra violeta
VBUN Virus Bunyamwera

VDM Vesículas de doble membrana
VEMC Virus de la encéfalo-miocarditis
VHC Virus de la hepatitis C
VHS-1 Virus del herpes simple tipo 1
via Virus Bunyamwera intracelular anular o de tipo I
vid Virus Bunyamwera intracelular denso o de tipo II
VIH Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VLP *Virus like particle*
VRUB Virus Rubella
VV Virus Vaccinia
WNV_{KN} *West Nile virus*
wt *Wild type*
YFP Proteína fluorescente amarilla
YKO *Yeast single gene knockout*
YNB *Yeast nitrogen base*
YPD *Yeast extract peptone dextrose*

Resumen

Viruses are intracellular pathogens that need the host cell machinery to multiply. Many RNA and some DNA viruses perform their genome replication and transcription in the cytoplasm of eukaryotic cells in specialized compartments or organelle-like structures called viral factories. These platforms enhance replication efficiency while protecting the virus from the host defenses. The biogenesis of viral factories involves the recruitment of cell organelles and rearrangements of cell membranes. Therefore, virus replication is usually associated with intracellular membranes and the assembly of different types of replication organelles. Ultrastructural imaging of the replication organelles within the cell context should significantly increase our understanding of the architecture and organization of these specialized compartments. In this work we have focused on the study of the factories and replication organelles built by several RNA viruses. Tombusvirus, bunyavirus and reovirus were studied in cells with a variety of light and electron microscopy methods.

Tombusvirus induces the formation of a complex system of membranes where the viral replication takes place in small vesicles or spherules. Serial sectioning and three dimensional reconstructions showed that the compartment was surrounded by mitochondria and endoplasmic reticulum (ER). METTEM (metal tagging transmission electron microscopy) technique allowed the visualization of viral replicase molecules in the membranes of the compartment and their incorporation and activation in spherules. The study of cellular proteins involved in replication complex formation demonstrated that the ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport) protein Vps4 is a stable component of the active tombusvirus replication complex and necessary for the formation and maintenance of viral spherules. Other ESCRT proteins (Vps24, Snf7 and Vps23) are also necessary for the formation of tombusvirus spherules. In the *Δpahl* mutant the replication complex assembled in a compartment associated with ER, forming a highly specialized platform that harbors the virus replication. METTEM and electron tomography showed that in regions of the compartment where the replicase is active, the molecules have a high degree of aggregation and packing. Furthermore, inhibition of actin in yeast and plant cells resulted in a proliferation of the specialized membranes that support tombusvirus replication.

Bunyamwera virus (BUNV) assembled mini-factories in Vero cells, consisting of fragmented Golgi stacks surrounded by mitochondria and ER. The 3D model showed contacts between mitochondria and ER with replication complexes and intracellular viruses. The nucleoprotein N and the polymerase L were enough to assemble the functional BUNV replication complex, recruit mitochondria and ER, build the factory and assemble virus-like particles. Polymerase L molecules accumulated in intracellular membranes and concentrated in

densely packed aggregates inside viral spherules. During BUNV infection, mitochondrial proteins p32 and Mfn-2 and myosin-9 were recruited to the factory. The presence of Mfn2 suggests that this protein could mediate the contacts between mitochondria and between mitochondria and ER membranes. P32 always accompanied the factory elements at different times postinfection, supporting that it might be an important factor for replication and/or morphogenesis. Results with blebbistatin treatment suggests a role of myosin-9 in the transport of RNPs from the replication complexes to the assembly sites.

3D models showed that reovirus inclusions are formed by a lattice of smooth membranes and microtubules, surrounded by mitochondria and RER. Lipid droplets are often seen as well. Inclusion membranes and viral particles established contacts with mitochondria and the RER network. In the virus egress area, close to the plasma membrane, viral particles are linked to ER membranes and microtubules. This fact points to a new mechanism that could mediate reovirus egress without cell lysis.

In summary, the RNA viruses studied in this thesis project assemble replication complexes in association with membranes and cell organelles. METTEM and electron tomography showed for the first time the organization of viral polymerases molecules inside the active replication complexes whose present a high level of packing and aggregation. Besides, it has been shown that several cellular proteins have a role in the assembly and maintenance of the replication complex. The data obtained in this thesis could be an initial step to study the factors and cell pathways involved in early organelle recruitment and viral factory biogenesis.

Introducción

1. Replicación viral: factorías virales

Los virus son patógenos intracelulares obligados, necesitan la maquinaria de una célula huésped para replicarse y formar nuevos virus. Generalmente, los procesos de replicación y ensamblaje viral tienen lugar en compartimentos intracelulares específicos, denominados factorías o inclusiones virales. De esta forma, el virus concentra los elementos necesarios para replicarse en una zona concreta de la célula, consiguiendo propagarse de una forma más efectiva. Además, la generación de factorías virales también protege al genoma del virus del sistema inmune de la célula hospedadora. La formación de sitios especializados para la replicación viral lleva consigo la reorganización del citoesqueleto y de los orgánulos celulares. Es decir, el uso de los recursos de la célula hospedadora implica que el virus tiene que interactuar con la célula, modificar sus rutas de señalización intracelular, y reorganizar los orgánulos celulares generando las factorías virales. Por lo tanto, la interacción del virus con la célula hospedadora es un proceso dinámico y complejo, que conlleva numerosas interacciones entre los elementos del virus (genoma y proteínas) y los de la célula (proteínas y membranas). La microscopía electrónica de transmisión (MET) y la tomografía electrónica han sido claves para definir la estructura y composición de las factorías virales ensambladas por distintos virus. Además, las factorías virales son complejos macromoleculares de gran tamaño, por ello, el análisis de cortes seriados y reconstrucción en tres dimensiones (3D) ha permitido obtener información más completa del compartimento, y también visualizar fenómenos poco frecuentes como son los contactos entre orgánulos de la factoría.

Algunos virus ensamblan la factoría viral en el núcleo de la célula aunque su organización no se conoce bien, probablemente, por la información limitada que hay sobre la arquitectura y funciones de los componentes del núcleo (Chang *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2010). Sin embargo, se han estudiado mucho las factorías virales ensambladas en el citoplasma, las cuales, presentan dos características comunes: 1) su organización depende del reclutamiento de factores virales y celulares alrededor de orgánulos de replicación ensamblados por las polimerasas virales en membranas intracelulares, y 2) la mayoría de las factorías reclutan y usan mitocondrias (de Castro *et al.*, 2013). En la Figura 1 se muestra un esquema con las factorías virales ensambladas por diferentes virus en distintos orgánulos celulares presentes en el citoplasma y en el núcleo. En el esquema de la Figura 1 se puede apreciar como los virus ensamblan complejos replicativos (CRs) de distinta morfología: esférulas, vesículas de doble membrana y tubos. Características de los complejos replicativos se verán con más detalle en el siguiente apartado.

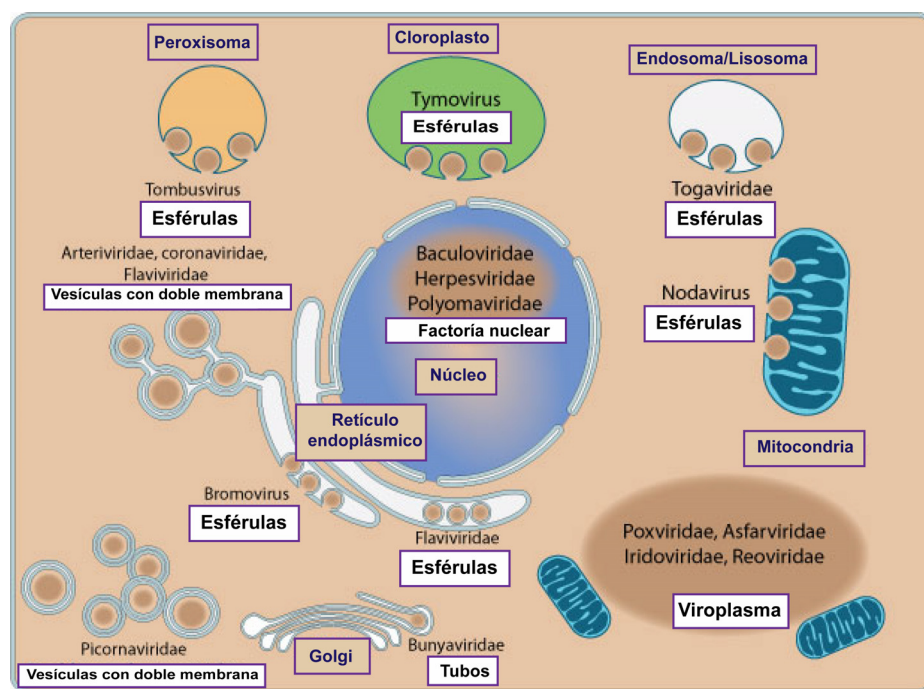


Figura 1. Factorías virales ensambladas por distintos virus.

Las factorías virales pueden ser nucleares o citoplásmicas. En el citoplasma el ensamblaje del complejo replicativo (CR) tiene lugar en membranas intracelulares procedentes de diferentes orgánulos. Modificado de http://viralzone.expasy.org/all_by_species/1951.html.

Un ejemplo de factoría ensamblada en el núcleo es la producida por herpesvirus. Después de la penetración en la célula, las nucleocápsidas son transportadas por los microtúbulos hasta los poros nucleares, en donde el ADN es liberado dentro del núcleo (Granzow *et al.*, 1997; Sodeik *et al.*, 1997), a la vez que ciertas proteínas del tegumento podrían modificar el metabolismo celular. Mientras progresa la síntesis de ADN viral, las nuevas moléculas de ADN y los complejos de replicación se acumulan en estructuras globulares dentro del núcleo, denominadas compartimentos de replicación. La transcripción viral, síntesis de ADN y ensamblaje de la cápsida tienen lugar en las factorías nucleares. Sin embargo, la adquisición de la envuelta ocurre en el citoplasma, donde las glicoproteínas virales se acumulan en el *trans*-Golgi, a partir del cual se produce la gemación de los nuevos viriones. Finalmente, los viriones son liberados mediante la fusión de vesículas derivadas del Golgi con la membrana plasmática (Granzow *et al.*, 2001; Granzow *et al.*, 1997). Los cuerpos nucleares de la leucemia promielocítica (*promyelocytic leukemia nuclear bodies*, PML-NBs) son buenos candidatos para el ensamblaje de factorías nucleares. Se han asociado con replicación de ADN viral en el caso del virus del herpes simple tipo 1 (VHS-1), adenovirus de tipo 5 (Ad5), y poliomavirus como el *Simian virus 40* (SV-40) (Maul *et al.*, 2000; Doucas *et al.*, 1996; Maul *et al.*, 1996). En etapas

tempranas de la infección por poliomavirus, aparecen estructuras tubulares dentro del núcleo adyacentes a matrices de virus ensamblados y parece que los virus geman a partir de los extremos de las estructuras en forma de tubo. En la Figura 2A se muestra una reconstrucción 3D, obtenida mediante tomografía electrónica, de una factoría nuclear temprana de poliomavirus en donde se observan dichas estructuras tubulares. En la Figura 2B se muestra mediante MET una factoría nuclear tardía generada por poliomavirus, donde los agregados de virus ensamblados se extienden ocupando prácticamente todo el núcleo y no se detectan estructuras tubulares.

Ciertos virus ADN ensamblan la factoría viral en el citoplasma, es el caso de poxvirus, iridovirus, y *African swine fever virus* (ASFV, *Asfarviridae*). En una etapa temprana de la infección viral, se produce una exclusión de proteínas y orgánulos de la célula huésped en la región donde se va a ensamblar la factoría viral, en este caso denominada viroplasma. Esto genera un área "vacía" cerca del núcleo de la célula. Al mismo tiempo, se acumulan proteínas virales, ADN viral, mitocondrias, elementos del citoesqueleto y membranas intracelulares de distinta naturaleza. Algunas de estas membranas son utilizadas para la replicación viral, mientras que otras se usan para la constitución de la envuelta del virus (Novoa *et al.*, 2005b).

Las factorías citosólicas se caracterizan, en células animales y vegetales, por el uso de membranas de distintos orgánulos celulares (retículo endoplásmico (RE), aparato de Golgi, endosomas, peroxisomas, mitocondrias o cloroplastos, esquema Figura 1) y por la reorganización del citoesqueleto. En las membranas de dichos orgánulos celulares distintos virus ARN anclan sus complejos de replicación. Dentro de los virus ARN de cadena sencilla y polaridad positiva (*single stranded*, ssRNA (+)) se encuentra la familia *Togaviridae*, que incluye el virus Rubella (VRUB). El VRUB ensambla su factoría viral en endosomas o lisosomas. En células infectadas, se observaron endosomas y lisosomas modificados, constituyendo una estructura vesicular especial denominada vacuola citopática (*cytopathic vacuole*, CPV). En la Figura 2C se puede observar la imagen de una CPV obtenida mediante microscopía electrónica; mitocondrias y retículo endoplasmático rugoso (RER) rodean a la CPV. Con tomografía electrónica y reconstrucción 3D se pudo estudiar la estructura de las CPVs con mayor detalle. En la Figura 2D se muestra una CPV con vesículas y láminas en su interior. En el caso de togavirus, las CPVs son el sitio de replicación del ARN, y quizás el lugar donde se da la transcripción del ARN viral y el ensamblaje de la nucleocápsida (Fontana *et al.*, 2010). La capacidad para formar una factoría viral en el citoplasma es una característica común a muchos virus ARN, como se puede observar en la Figura 1.

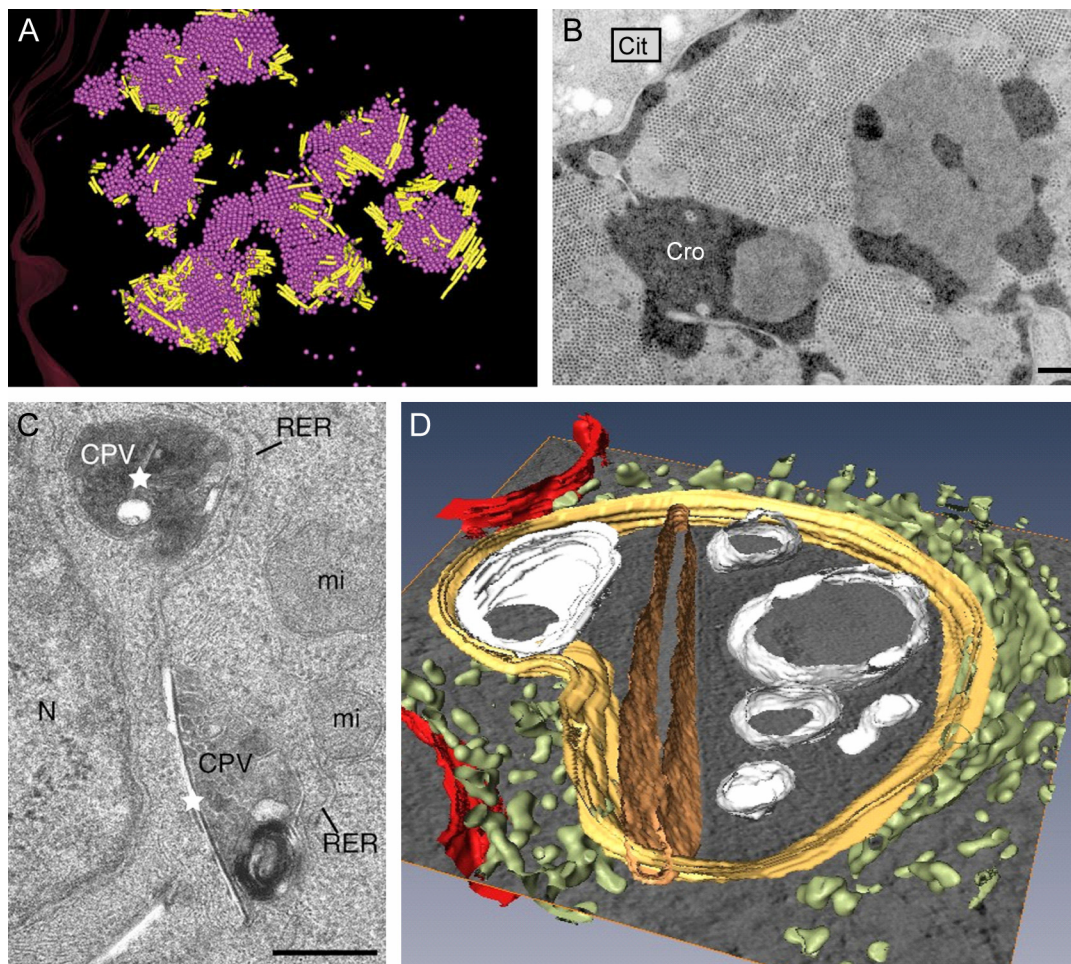


Figura 2. Factorías virales ensambladas en núcleo o citoplasma

A y B) Células infectadas por poliomavirus fueron crio-sustituídas, incluidas en resina epoxi y analizadas mediante tomografía electrónica. A) Modelo 3D de una factoría nuclear temprana de poliomavirus. Se observan estructuras tubulares adyacentes y conectando con las matrices de virus (virus, rosa; estructuras tubulares, amarillo; membrana nuclear, granate). B) Factoría nuclear tardía de poliomavirus, el núcleo de la célula está lleno de agregados de virus (Cit, citoplasma; Cro, cromatina). Modificado de Erickson *et al.*, 2012. C y D) Células infectadas por virus Rubella, crio-sustituídas, incluidas en resina y analizadas mediante tomografía electrónica. C) Se observan vacuolas citopáticas o CPVs (estrella), en región perinuclear y rodeadas por mitocondrias (mi) y retículo endoplasmático rugoso (RER) (núcleo, N). D) Modelo 3D de una factoría viral de virus Rubella o CPV. Se detectaron vesículas y láminas rígidas en el interior de las CPVs (mitocondrias, rojo; RER, verde; CPV, amarillo; vesículas o vacuolas, blanco; láminas, marrón). Modificado de Fontana *et al.*, 2010. Barras: 700 nm en B; 200 nm en C.

2. Arquitectura de los complejos replicativos (CRs)

Al principio de la infección viral, las polimerasas virales y los cofactores interaccionan con las membranas celulares, donde ensamblan los CRs (Miller and Krijnse-Locker, 2008). En dichos compartimentos se lleva a cabo la síntesis de múltiples copias del genoma viral que es transferido a los sitios de ensamblaje. Los CRs se forman en orgánulos modificados, también

denominados orgánulos de replicación, que a su vez son englobados dentro de la factoría. En la Figura 3 se muestra cómo los orgánulos de replicación pueden estar constituidos por más de un CR y es en estas estructuras donde se lleva a cabo la replicación del genoma viral. Sin embargo, las factorías virales pueden contener más de un orgánulo de replicación además de otros elementos celulares, el conjunto de la estructura desempeña distintas funciones como replicación, ensamblaje, maduración y transporte de virus.

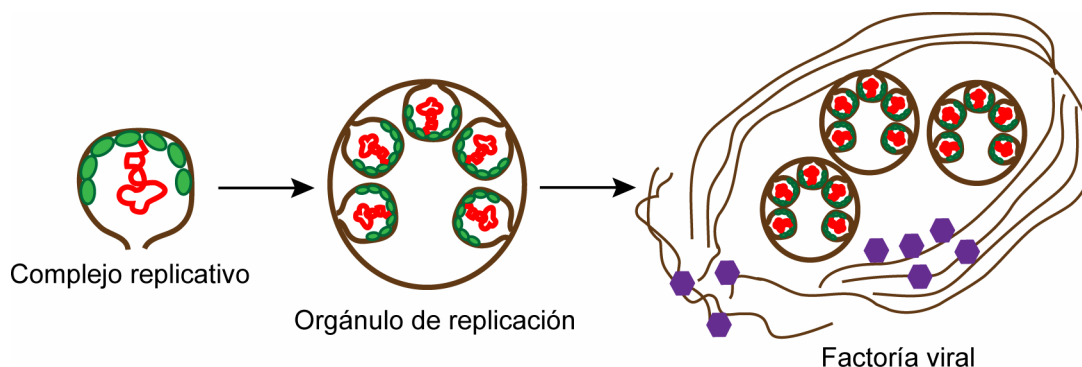


Figura 3. Esquema de la organización de los complejos replicativos en los orgánulos de replicación y en las factorías virales

La replicación del genoma viral tiene lugar en el interior de los complejos replicativos (CRs), que están contenidos en compartimentos denominados orgánulos de replicación. Las factorías virales están constituidas por varios orgánulos de replicación y por distintos elementos celulares, y desempeñan funciones clave para la multiplicación y propagación viral.

Aunque la mayoría de los virus ensamblan su CR en membranas intracelulares, también pueden usar la membrana plasmática. Este es el caso de los alphavirus y del VRUB, miembros de la familia *Togaviridae*, virus ARN que primero ensamblan su CR en la cara citosólica de la membrana plasmática (Risco *et al.*, 2012; Frolova *et al.*, 2010; Spuul *et al.*, 2010). Dichos complejos son posteriormente internalizados y transportados hasta los lisosomas, donde continúa la replicación viral. En el caso de virus Vaccinia (VV), miembro de la familia *Poxviridae*, ensambla unas estructuras denominadas "mini-núcleos" asociadas al RER, donde tiene lugar la replicación viral (Tolonen *et al.*, 2001). Sin embargo, la mayoría de los virus que replican en el citosol ensamblan estructuras en membranas intracelulares que pertenecen a tres categorías : vesículas de una sola membrana o esférulas, membranas cúbicas y matrices oligoméricas (Figura 4).

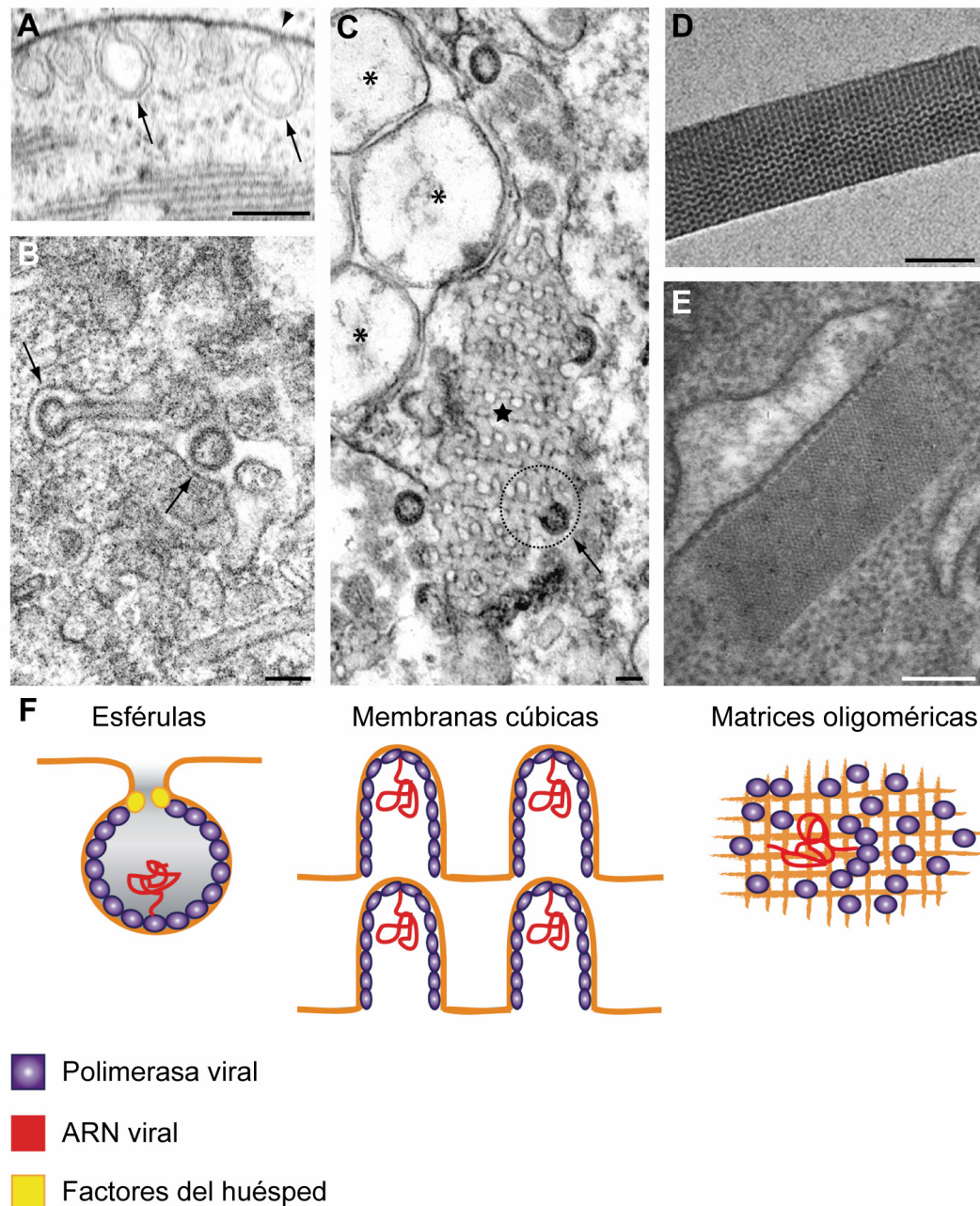


Figura 4. Microscopía electrónica de transmisión de los distintos tipos de complejos replicativos

A) MET de una célula de planta infectada por *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV). Las flechas apuntan a las estructuras donde se da la replicación viral (esférulas virales), en la periferia de un cloroplasto. El cuello, o estructura que conecta la esférula con el citoplasma, está marcado por una punta de flecha. B) Células de mamífero infectadas por virus Bunyamwera. Las esférulas (flechas) están asociadas con las membranas del Golgi. La esférula de la izquierda está conectada con una estructura tubular. C) Membranas cúbicas (estrella) en contacto con vesículas de doble membrana (asteriscos) en células de mamífero infectadas por coronavirus. El círculo rodea a un grupo de membranas cúbicas que conectan con un virus gemma (flecha). D) Matrices oligoméricas ensambladas *in vitro* por la ARN polimerasa ARN dependiente de poliovirus en presencia de ARN, visualizado por tinción negativa y MET. E) Matriz oligomérica adyacente a RER en una célula pancreática infectada por coxsackievirus. F) Modelos que representan los complejos replicativos de las imágenes. Barras: 100 nm. Modificado de de Castro *et al.*, 2013.

En la formación de las esférulas intervienen proteínas virales no estructurales, ARN viral y cofactores celulares. Son vesículas que se caracterizan por presentar una apertura al citosol. Se forman a partir de invaginaciones de membranas de orgánulos celulares como mitocondrias, RE, lisosomas, peroxisomas, aparato de Golgi o cloroplastos (Nagy and Pogany, 2011; Novoa *et al.*, 2005b) (Figura 4A y B). El cuello de la esférula o conexión con el citoplasma, restringe la entrada de moléculas al interior de la vesícula, protege al genoma viral de la degradación por el sistema inmune de la célula y también controla la salida del genoma viral recién sintetizado. Un ejemplo de esférulas virales son las ensambladas por: *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) en cloroplastos (Prod'homme *et al.*, 2001) (Figura 4A), *Brome mosaic virus* (BMV) en el RE (Schwartz *et al.*, 2002), *Semliki forest virus* (SFV) en lisosomas modificados (Zhao *et al.*, 1994) o *Flock house virus* (FHV) en mitocondrias, el cual fue el primer orgánulo de replicación estudiado mediante tomografía electrónica y reconstrucción 3D (Kopek *et al.*, 2007). El virus Bunyamwera (VBUN) ensambla esférulas atípicas en las membranas del aparato de Golgi. Dichas esférulas se muestran en la Figura 4B, se caracterizan por estar unidas a una estructura cilíndrica o tubo abierto al citosol.

En células infectadas por distintos tipos de virus se han observado estructuras tubulovesiculares denominadas membranas cúbicas (Figura 4C). Probablemente, dichas plataformas se forman a partir de RE, y son inducidas tanto por virus ARN como ADN. Consisten en bicapas lipídicas plegadas con gran curvatura, que forman una plataforma donde tiene lugar la replicación y ensamblaje viral. Se estudió la capacidad de estas membranas para actuar como factoría viral, y se determinó que los canales interconectados de estas estructuras podrían facilitar el transporte de moléculas desde el CR hasta el citoplasma o el núcleo. Además los poros de la superficie podrían controlar la entrada de materiales, y la elevada curvatura podría facilitar la gemación de las partículas virales (Deng *et al.*, 2010). Este tipo de estructuras se han observado en células infectadas por coronavirus (síndrome respiratorio agudo y severo, del inglés SARS); las membranas cúbicas estaban conectadas con vesículas de doble membrana (VDM) y virus nacientes (Goldsmith *et al.*, 2004) (Figura 4C). En la Figura 5A se muestra una reconstrucción 3D obtenida mediante tomografía electrónica de las VDMs conectadas con RE, inducidas por SARS en células infectadas. Se pensaba que las VDMs constituían el sitio de replicación viral, pero con tomografía electrónica y reconstrucción 3D se observó que carecían de conexión con el citosol (Knoops *et al.*, 2008). Además, los estudios de microscopía electrónica sugieren que las membranas cúbicas son el sitio de replicación viral. En dichas membranas también se detectaron las replicasas virales y el ARN de doble cadena (*double stranded*, dsRNA), considerado un intermediario de replicación viral, lo que también apunta que constituyen el orgánulo de replicación. Las VDMs podrían desempeñar distintas funciones, por

ejemplo como sitio de almacenamiento para el ARN o ADN viral recién sintetizado. En el caso de poliovirus, parece que las VDMs constituyen el sitio de replicación viral, pero sólo en etapas tardías de la infección. La síntesis de ARN viral se lleva a cabo en vesículas de una sola membrana en la fase exponencial de replicación viral (Belov *et al.*, 2012). El virus del Dengue, perteneciente a la familia *Flaviviridae* y patógeno humano muy importante, ensambla un CR a partir del RE que ha sido caracterizado mediante tomografía electrónica (Welsch *et al.*, 2009). Con la reconstrucción 3D se pudo apreciar que existía una conexión entre los sitios de replicación (esférulas virales) y los lugares de ensamblaje, presentes en membranas del RE cercanas. Por lo tanto, los modelos en tres dimensiones sirven para estudiar la posible conexión que existe entre las distintas fases del ciclo de replicación viral dentro de la factoría.

El virus de la hepatitis C (VHC), miembro de la familia *Flaviviridae* ensambla VDMs muy similares a las observadas en células infectadas por picornavirus (Figura 5B), coronavirus y arterivirus (Belov *et al.*, 2012; Knoops *et al.*, 2012; Romero-Brey *et al.*, 2012; Limpens *et al.*, 2011; Knoops *et al.*, 2008). Se ha demostrado que las VDMs generadas por VHC se transforman en esférulas de una sola membrana en etapas tardías de la infección viral (Romero-Brey *et al.*, 2012) (Figura 5C). Además, trabajos recientes han demostrado que existe una conexión entre los distintos tipos de estructuras encontradas en células infectadas por poliovirus, flavivirus y coronavirus (Risco *et al.*, 2014). En el modelo 3D de las Figuras 5C-F se muestra el CR formado por flavivirus (*West Nile virus* (WNV_{KN}), virus del Dengue y VHC); así como un modelo de la disposición del ARN viral en el interior de las esférulas (Figura 5E).

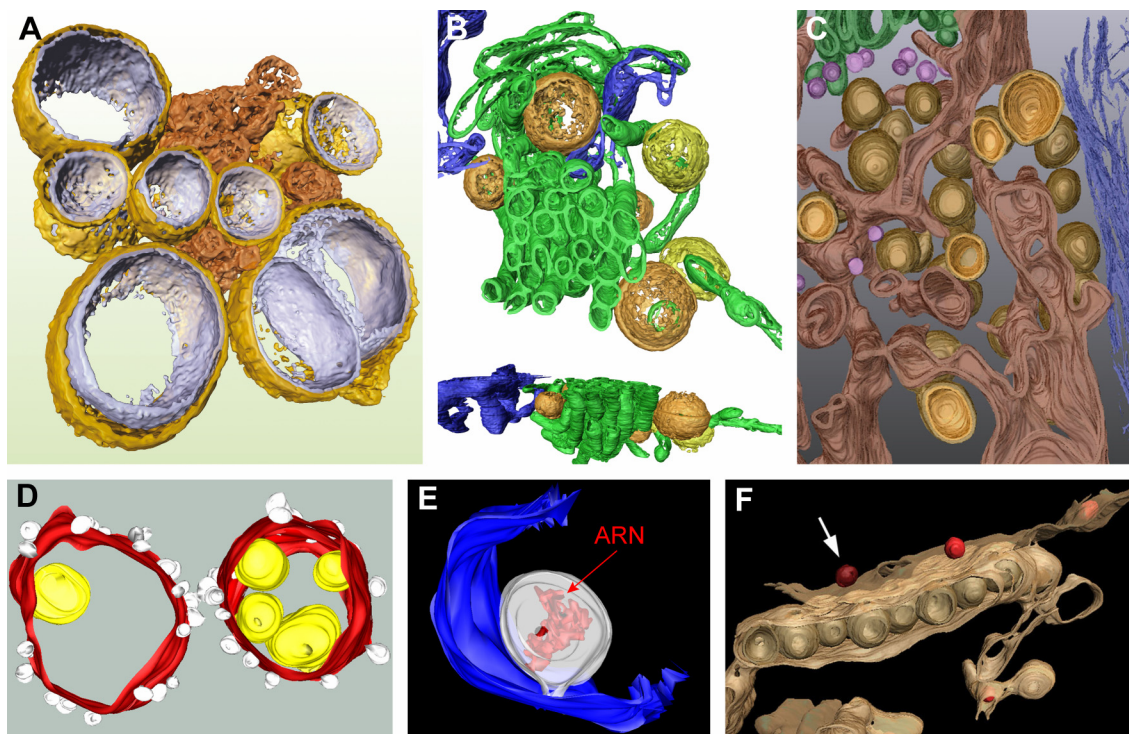


Figura 5. Modelo 3D de los orgánulos de replicación

Organización de los orgánulos que contienen los complejos replicativos (CRs) estudiados por tomografía electrónica y reconstrucción 3D, a partir de células infectadas por coronavirus (A), picornavirus (B) o flavivirus (C-F). A) Modelo en tres dimensiones de VDMs interconectadas y ensambladas a partir de membranas de RE inducidas por coronavirus (SARS). B) Orgánulo de replicación ensamblado por coxsackievirus que contiene tubos constituidos por una sola membrana (verde), VDMs abiertas (naranja) y cerradas (amarillo), y membranas de RE (azul). C) Complejo de replicación inducido por virus de la hepatitis C (VHC) constituido por membranas del RE (marrón oscuro), VDMs (marrón claro) y vesículas de una sola membrana o esférulas (rosa). D) Reconstrucción 3D del orgánulo de replicación de *West Nile Virus* (WNV_{KN}) en la que se observan vesículas individuales (amarillo) asociadas con el RER (rojo). Los ribosomas se muestran en blanco. E) Modelo estructural de la disposición del ARN viral en el interior de las esférulas. F) Plataforma de replicación del virus del Dengue (marrón), con esférulas donde se da la replicación viral y partículas virales nacientes (rojo). Modificado de Risco *et al.*, 2014).

La tercera clase de CR en el que se da la replicación viral, son las matrices oligoméricas (Figura 4D y E). Estudios *in vitro* en poliovirus mostraron que las ARN polimerasas ensamblaban matrices en 2 dimensiones (2D) (Lyle *et al.*, 2002; Hobson *et al.*, 2001). Además, se ha demostrado que las polimerasas virales inducen la generación de matrices oligoméricas en células infectadas. Por ejemplo, MET a partir de células infectadas con coxsackievirus mostraron dicha organización intracelular, en matrices oligoméricas (Figura 4E), muy similar a la estructura formada por las ARN polimerasas ARN dependientes *in vitro* (Figura 4D). La organización o empaquetamiento de las polimerasas virales parece necesario para el ensamblaje del CR funcional, y para la replicación del genoma viral de forma más efectiva.

3. Tomato bushy stunt virus

La familia *Tombusviridae* está constituida por ocho géneros: *Tombusvirus*, *Carmovirus*, *Necrovirus*, *Dianthovirus*, *Machlomovirus*, *Avenavirus*, *Aureusvirus* y *Panicovirus* (Russo *et al.*, 1994). Los miembros de esta familia son virus que infectan distintas especies de plantas y se transmiten por el suelo, a través de hongos y nemátodos. Dentro del género *Tombusvirus* existen importantes patógenos de plantas como el virus del enanismo ramificado del tomate (*Tomato bushy stunt virus*, TBSV) y el virus de la necrosis del pepino (*Cucumber necrosis virus*, CNV). Infecciones por dichos virus han generado importantes pérdidas en agricultura. En la naturaleza, TBSV infecta cosechas de especies como el tomate, pimiento, alcachofa, cerezas, uvas y también plantas ornamentales. En la Figura 6D se muestra uno de los hospedadores experimentales de TBSV, la planta *Nicotiana benthamiana*. Actúa produciendo lesiones necróticas, y a veces mosaicos, terminando en infección sistémica en algunos casos. TBSV y otros tombusvirus se utilizan como modelo en biología estructural para estudios de expresión génica y replicación de virus ssRNA (+), y para analizar procesos importantes como movimiento de virus y patogenicidad.

3.1. Morfología y genoma viral

El género *Tombusvirus*, prototipo de la familia *Tombusviridae*, está constituido por virus desnudos, de 28-34 nm de diámetro y con simetría icosaédrica (T=3). En la Figura 6 se puede observar un esquema de la estructura del virus, imágenes de MET y su estructura obtenida mediante cristalografía.

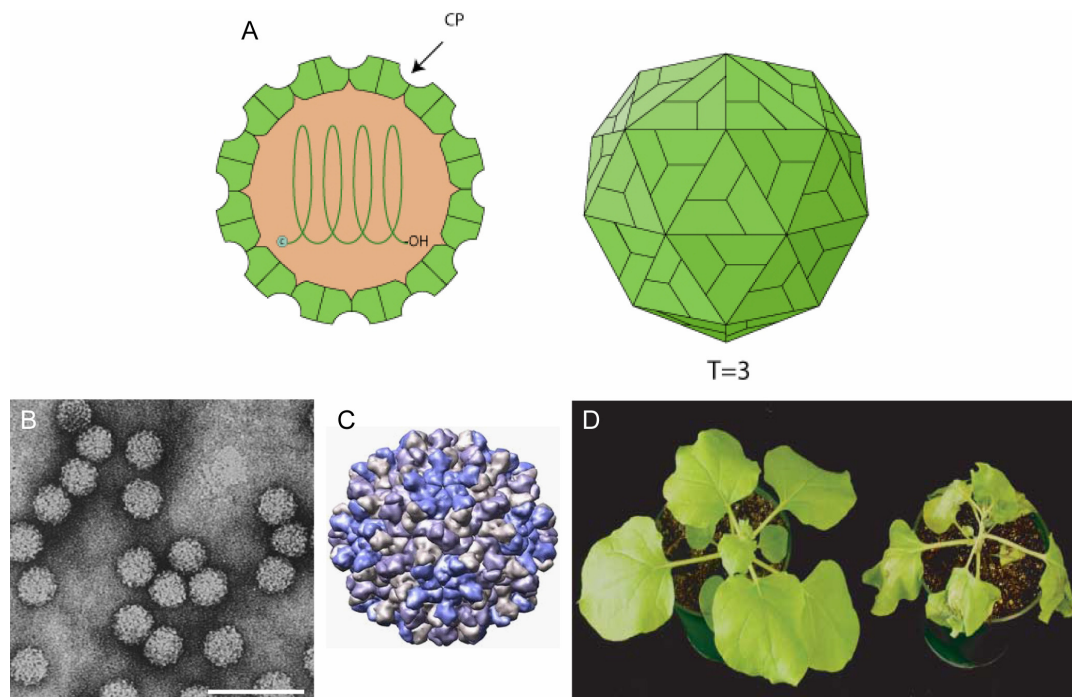


Figura 6. Estructura de TBSV y su hospedador experimental *Nicotiana benthamiana*

A) Esquema de la estructura de TBSV donde se observa la simetría icosaédrica ($T=3$). Modificado de http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/637.html. B) MET de TBSV en la que se observan los virus de unos 30 nm de diámetro. Barra de 50 nm. Modificado de <http://pvo.bio-mirror.cn/descr825.htm>. C) Modelo atómico de la estructura de TBSV obtenida mediante cristalografía de rayos X (Olson *et al.*, 1983). D) Síntomas de la infección por TBSV en *Nicotiana benthamiana* 1 semana después de la inoculación (derecha), comparado con una planta no infectada (izquierda) (Yamamura and Scholthof, 2005).

El genoma está constituido por una molécula de ssRNA (+), de aproximadamente 4.8 kb y que carece del extremo 5' cap y 3' poli A, presentando en su lugar las secuencias conservadas 5'-AGAAAU . . . y . . . GCAGCCC-3' (Russo *et al.*, 1994). El genoma codifica 5 marcos de lectura abiertos u *open reading frames* (ORFs); en el extremo 5' se encuentran dos ORFs solapantes que codifican p33 y p92, proteínas que comparten el codón de iniciación debido al solapamiento de las dos ORFs. Dichas proteínas se transcriben a partir del genoma viral directamente y son esenciales para la replicación viral (Scholthof *et al.*, 1995). A continuación está la ORF que codifica para la proteína de la cápside (*coat protein*, CP) o p41. En el extremo 3' se encuentran las ORFs que codifican p22 y p19. La expresión de las ORFs que codifican p41, p22 y p19 requiere ARNm virales adicionales, denominados subgenómicos (ARNm sg) (Miller and Koev, 2000). Durante la infección por tombusvirus se transcriben dos ARNm sg de forma regulada en el tiempo. Así, al principio de la infección se produce el ARNm sg que codifica p22 y p19, mientras que en una etapa tardía se sintetiza el ARNm sg que codifica p41 (Hillman *et al.*, 1989). En la Figura 7 se muestra un esquema de la organización del genoma de TBSV.

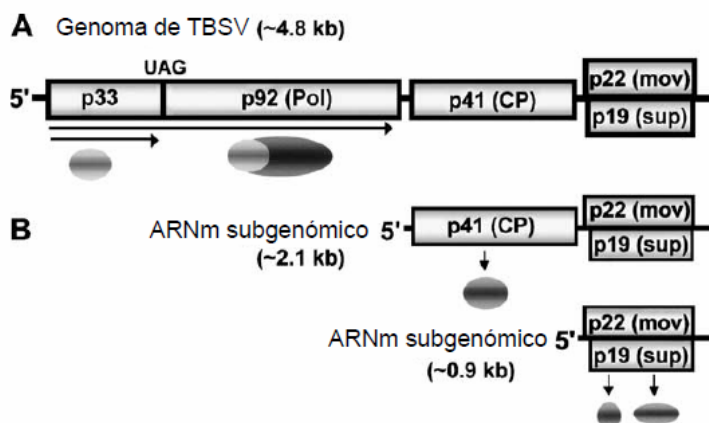


Figura 7. Representación del genoma y de los ARNm subgenómicos de TBSV

A) Esquema del genoma de TBSV. Se muestran las cinco regiones codificantes u ORFs y las proteínas codificadas (p33, p92, p41, p22 y p19). Entre paréntesis figuran las funciones de las distintas proteínas: Pol, polimerasa; CP, proteína de la cápsida; mov, movimiento y sup, supresor del silenciamiento génico. B) ARNm subgenómicos (sg) de TBSV, son transcritos durante la infección viral y regulan la expresión de p41, p22 y p19. Modificado de White and Nagy, 2004.

3.2. Proteínas virales

-Proteínas de replicación viral p33 y p92

Tombusvirus codifica dos proteínas implicadas en replicación viral, la proteína auxiliar p33 y la ARN polimerasa ARN dependiente p92, la cual representa la subunidad catalítica para la síntesis del ARN viral. Ambas proteínas forman parte del CR, *in vivo* se acumulan en una proporción de 20:1 (p33:p92) y son esenciales para la replicación viral (Scholthof *et al.*, 1995). La proteína p33 interacciona con distintas proteínas virales y celulares desempeñando importantes funciones durante la replicación. Por ejemplo, oligomeriza e interacciona con el ARN viral facilitando su síntesis y el ensamblaje del CR. Además, la dimerización de p33 es necesaria para el reconocimiento selectivo de una secuencia en el ARN viral, implicando su reclutamiento durante la replicación. Por otro lado, interacciona con p92 determinando su localización intracelular en el CR. La interacción con proteínas celulares puede facilitar el ensamblaje del CR, pero también existen proteínas celulares con efecto inhibitorio sobre la replicación viral; es decir, proteínas que inhiben el ensamblaje del CR o que promueven la degradación de p33 (Nagy *et al.*, 2012).

-Proteína de la cápsida p41 (CP)

La proteína de la cápsida, subunidad de 41 kDa, se ensambla con el genoma dentro de partículas virales de alrededor de 30 nm con simetría icosaédrica, constituidas por 180 moléculas de CP (Russo *et al.*, 1994). La proteína p41 no es necesaria para el paso de célula a célula o para la infección sistémica de los hospedadores, pero ambos procesos se retrasan en su ausencia (Dalmay *et al.*, 1993; Hillman *et al.*, 1989). En el caso del CNV, CP facilita la transmisión entre plantas a través de hongos, y se han identificado aminoácidos específicos que son esenciales para la unión a polisacáridos de la superficie de zoosporas (Kakani *et al.*, 2001; Robbins *et al.*, 1997).

-Proteína del movimiento p22

En plantas, p22 está asociada a membranas y es esencial para el movimiento entre células (Dalmay *et al.*, 1993). Se ha demostrado que p22 interacciona con el factor de transcripción HFi22 de la planta del tabaco (Desvoyes *et al.*, 2002). La unión de p22 con HFi22 se correlaciona con el movimiento entre células promovido por p22, lo que sugiere un posible papel de esta interacción en el transporte intracelular. Se requieren más estudios para determinar el mecanismo de acción a través del cual, la unión de p22 con el factor de transcripción media el movimiento de virus de una célula a otra.

-Supresor del silenciamiento génico p19

En general, la supresión de p19 implica una reducción en la proporción de infecciones sistémicas y en los síntomas ocasionados por la infección en plantas (Dalmay *et al.*, 1993). Además, p19 es un supresor del silenciamiento génico, actúa uniéndose y secuestrando los ARN interferentes (ARNi), esenciales para el silenciamiento (Silhavy *et al.*, 2002). Esta proteína es esencial para generar infección persistente en plantas, su ausencia implica la eliminación en hojas infectadas del ARN viral tras dos semanas post infección (Qu and Morris, 2002).

3.3. Ciclo de replicación viral

La entrada de tomosvirus en la célula de la planta tiene lugar a través de heridas. Posteriormente, se produce la desencapsidación y la liberación del genoma viral al citoplasma. La replicación del genoma viral primero requiere la transcripción de las proteínas de replicación (p33 y p92) a partir del ARN genómico. Dichas proteínas reclutan el ssRNA (+) para la replicación viral, lo cual, necesita el ensamblaje del CR en membranas intracelulares. En el caso de TBSV, el ensamblaje del CR se produce en la cara citosólica de la membrana del peroxisoma, aunque estudios recientes han demostrado que el RE también desempeña un papel importante en

la replicación de tombusvirus. Así, se ha observado que p33 se une a membranas de peroxisoma y de RE, a través de sus dos dominios transmembrana (McCartney *et al.*, 2005; Panavas *et al.*, 2005a). Por lo tanto, para el ensamblaje del CR de TBSV se produce una reorganización de las membranas de orgánulos celulares, produciendo esférulas o vesículas donde tiene lugar la replicación viral. El CR contiene proteínas virales y celulares, también implicadas en ensamblaje del CR y en replicación.

En el CR utilizando el ssRNA (+) como molde se produce la síntesis del ARN de cadena sencilla y polaridad negativa (ssRNA (-)) complementario. El ssRNA (-) será utilizado por las replicasas virales para sintetizar más moléculas de ssRNA (+), con las que se llevan a cabo rondas adicionales de transcripción y replicación. También tiene lugar la transcripción del ARNm sg que implica la síntesis del supresor del silenciamiento génico (p19) para que la infección sea efectiva, y de la proteína de movimiento (p22) para la invasión de las células adyacentes a través de los plasmodesmos. Más tarde en la infección viral, se produce la transcripción del ARNm sg que da lugar a la síntesis de la proteína de la cápsida (CP o p41), necesaria para la generación de nuevos virus mediante la encapsidación del genoma viral. De esta manera la expresión de las proteínas de TBSV se produce de forma coordinada en el tiempo. En la Figura 8 se muestra un esquema del ciclo vital de virus ssRNA (+) como los tombusvirus.

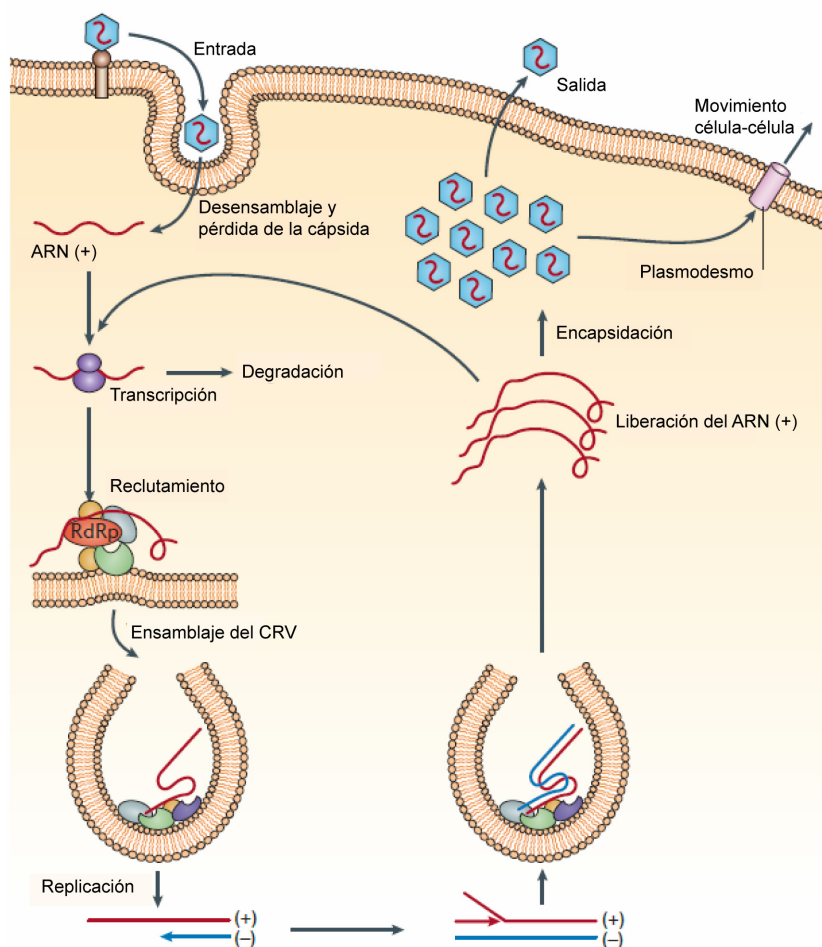


Figura 8. Modelo del ciclo de replicación de virus ssRNA (+)

Los virus ssRNA (+) entran en las células animales por endocitosis mediada por receptor o a través de heridas en células de planta. Dentro de la célula, el genoma viral es liberado al citoplasma, donde es transcrito y traducido por los ribosomas. Las proteínas de replicación recién sintetizadas son reclutadas junto con el ssRNA (+) a compartimentos o membranas subcelulares, donde se ensamblan los complejos replicativos (CRs). Se sintetiza una pequeña cantidad de ssRNA (-) que sirve como molde para la síntesis de más ssRNA (+). El ssRNA (+) es liberado al citosol, mientras que el ssRNA (-) es retenido en los CRs. El ssRNA (+) liberado comienza nuevos ciclos de transcripción y replicación, también es encapsidado formando nuevos virus, que salen de las células o bien pasan a células adyacentes a través de los plasmodesmos (en el caso de células de planta). Modificado de Nagy and Pogany, 2011.

En células eucariotas los ribosomas, generalmente, comienzan la transcripción a partir de los codones de iniciación en el extremo 5' (Kozak, 1989). Por lo tanto, en mensajeros policistrónicos como el de tombusvirus, solo las ORFs que están próximas al extremo 5' son transcritas eficazmente (p33 y p92), mientras que las ORFs del extremo 3' (p41, p22 y p19) son transcritas de manera poco efectiva. Para solventar este problema tombusvirus transcribe ARNm sg y de esta forma, las proteínas p41, p22 y p19 son sintetizadas de manera eficaz.

3.4. Las levaduras como modelo para el estudio de tombusvirus

El uso de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, (*S. cerevisiae*)) como modelo para el estudio de la interacción del virus con la célula hospedadora tiene muchas ventajas. Las plantas poseen genomas muy grandes, lo que hace que el proceso de secuenciación sea muy costoso. El tamaño del genoma, también dificulta los análisis para determinar la función que desempeñan ciertas proteínas celulares durante la infección de la planta. Además, la redundancia genética (duplicaciones funcionales) para muchos genes, es otro problema cuando se usan plantas como hospedadores. Sin embargo, *S. cerevisiae* posee un genoma de pequeño tamaño con unos 6000 genes, de los cuales alrededor de un 60% ha sido caracterizado. El tamaño pequeño del genoma también se traduce en menor redundancia genética. Otra ventaja del genoma compacto de levaduras, es que menos de un 7% de los genes tienen intrones, lo que facilita la predicción de las proteínas expresadas. Por otro lado, existen herramientas para la expresión controlada de genes seleccionados (Nagy, 2008). Una ventaja importante para el cribado (*screening*) del genoma en *S. cerevisiae* es la existencia de colecciones de mutantes *knockout*, como por ejemplo la librería YKO (*yeast single gene knockout*) (Tong AH, 2001), o librerías que contienen conjuntos de genes con expresión regulada, como la librería yTHC (Mnaimneh *et al.*, 2004). También están disponibles librerías de genes con marcadores fluorescentes para la localización subcelular de la proteína de interés, y genes con marcadores de afinidad para la purificación de proteínas (Ghaemmaghami *et al.*, 2003). Se han producido *microarrays* o chips con el ADN de la mayoría de los genes de *S. cerevisiae*, y también colecciones de proteínas con 4100 proteínas purificadas de dicho organismo (Zhu *et al.*, 2001). Por último, los bancos de genes de *S. cerevisiae* son los más completos entre los eucariotas.

3.5. Proteínas celulares implicadas en el ensamblaje del CR de tombusvirus y en replicación viral

La búsqueda de factores del huésped que afectan a la replicación de TBSV mediante cribado o *screening* del genoma de levaduras (Jiang *et al.*, 2006; Panavas *et al.*, 2005b), ha llevado a la identificación de siete proteínas ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*), implicadas en la ruta endosómica o multivesicular (*multivesicular body*, MVB) (Perlman and Resh, 2006; Morita and Sundquist, 2004). Las proteínas celulares identificadas incluyen: Vps23 y Vps28 (complejo ESCRT-I), Snf7 y Vps24 (complejo ESCRT-III); Doa4 ubiquitin isopeptidasa, Did2 que presenta una función relacionada con Doa4; y Vps4 que es una ATPasa de tipo A (Panavas *et al.*, 2005b). El reclutamiento de las proteínas ESCRT durante la replicación de tombusvirus podría facilitar el ensamblaje del CR, incluyendo la formación de

esférulas o vesículas en células infectadas (McCartney *et al.*, 2005). La generación de esférulas como orgánulo de replicación es una característica común a muchos virus ssRNA (+).

La ruta endosómica es la más importante para el reciclaje y clasificación de proteínas en células eucariotas, así regula el nivel de proteínas de la membrana plasmática eliminándolas por endocitosis, y transporta en vesículas las proteínas recién sintetizadas desde el *trans*-Golgi *network* (TGN) hasta endosomas, lisosomas o la membrana plasmática (Hurley and Emr, 2006; Slagsvold *et al.*, 2006; Katzmann *et al.*, 2002). En particular, la principal función de las proteínas ESCRT es la recirculación de proteínas desde la membrana del endosoma hasta el lumen a través de invaginación y formación de vesículas. Distintos tipos de virus, como retrovirus (Virus de la Inmunodeficiencia Humana, VIH), y virus ssRNA (+) y (-) (filovirus, arenavirus, rabdovirus y paramixovirus), utilizan la ruta MVB reclutando las proteínas ESCRT a la membrana plasmática, donde facilitan la salida de las partículas virales por gemación (Perlman and Resh, 2006; Morita and Sundquist, 2004).

El primer paso en la ruta endosómica es la ubiquitinación de proteínas, que sirve como señal para el transporte de dichas proteínas a los endosomas tardíos para su degradación (Hurley and Emr, 2006; Bowers and Stevens, 2005; Katzmann *et al.*, 2002). Las proteínas con ubiquitina se unen a Vps27, la cual recluta a Vps23 formando el complejo ESCRT-I. Posteriormente, el complejo ESCRT-I recluta a ESCRT-II, el cual a su vez recluta al complejo ESCRT-III. El complejo ESCRT-III agruparía las proteínas marcadas con ubiquitina en la membrana del endosoma tardío, y deformaría la membrana generando invaginaciones hacia el lumen (Malerod and Stenmark, 2009; Saksena *et al.*, 2009). Después Vps4 reciclaría las proteínas ESCRT, mientras que Doa4 reciclaría la ubiquitina, implicando la formación de múltiples vesículas hacia el lumen del endosoma o cuerpo multivesicular. A continuación, los cuerpos multivesiculares se fusionan con lisosomas o vacuolas, implicando la liberación del contenido (proteínas y lípidos) a su interior; o con la membrana plasmática, liberando su contenido al exterior de la célula (exocitosis) (Hurley and Emr, 2006; Bowers and Stevens, 2005; Katzmann *et al.*, 2002).

Barajas y colaboradores (Barajas *et al.*, 2009) demostraron que durante la replicación de tombusvirus se producía el reclutamiento de las proteínas ESCRT (Figura 9). El primer paso en el reclutamiento de Vps23 es la ubiquitinación de un pequeño porcentaje de p33 (p33-Ub) (Li *et al.*, 2008) (1. en Figura 9). Después p33-Ub se une a la proteína adaptadora Vps23 (2. en Figura 9) o a la proteína accesoria Bro1, seguido del reclutamiento del complejo ESCRT-III constituido por Snf7 y Vps24. El complejo ESCRT-III podría estar implicado en el ensamblaje del CR, facilitando la distribución de moléculas de p33 en la membrana, y promoviendo la formación de esférulas virales por invaginación (3. en Figura 9). Posteriormente, la proteína Doa4 eliminaría la

ubiquitina de p33-Ub, mientras que Vps4 con su actividad ATPasa podría estar implicada en el reciclaje de las proteínas ESCRT (4. en Figura 9). De esta manera, se ensamblaría el CR óptimo para la replicación de tombusvirus, donde la síntesis del ARN viral estaría protegida del sistema inmune de la célula, y la salida al citosol de ssRNA (+) recién sintetizados se podría producir de una forma regulada.

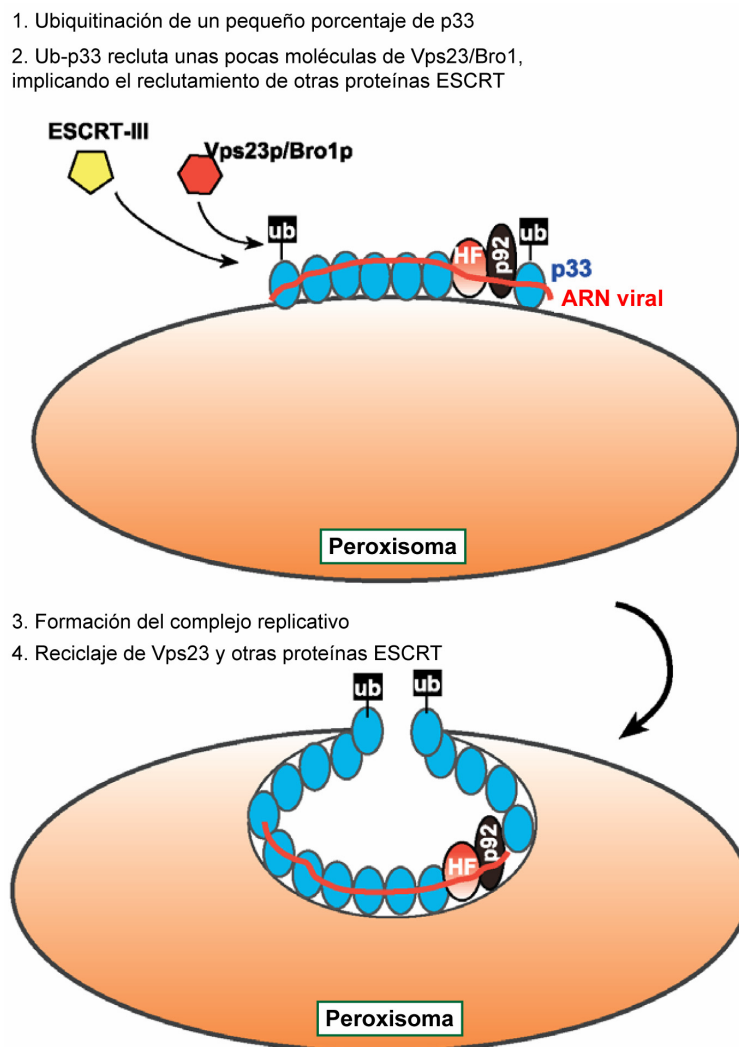


Figura 9. Modelo del reclutamiento de proteínas ESCRT durante la replicación de tombusvirus

El reclutamiento de Vps23/Bro1 a la membrana del peroxisoma por parte de una pequeña cantidad de p33, implicaría el reclutamiento de factores ESCRT adicionales. Después, ESCRT-III y Vps4 facilitarían el ensamblaje del complejo replicativo, lo que es necesario para evitar que el genoma viral sea reconocido por el sistema inmune de la célula y prevenir la destrucción del ARN viral presente en la esférula por la maquinaria de silenciamiento génico. Modificado de Barajas *et al.*, 2009.

Se han identificado muchas proteínas o factores celulares que facilitan o inhiben la replicación de tombusvirus. Por ejemplo, la chaperona Hsp70 (*heat shock protein*) está implicada en el ensamblaje y activación del CR de tombusvirus y en el reclutamiento de las proteínas necesarias para la replicación viral (Weeks *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009; Pogany *et al.*, 2008). La proteína del peroxisoma PEX19, también es una chaperona que recluta las replicasas virales a la membrana del peroxisoma (Pathak *et al.*, 2008). Además, se han identificado factores que modulan la síntesis de ARN viral: la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), en concreto Tdh2 y Tdh3, se une al ARN de TBSV facilitando su síntesis (Huang and Nagy, 2011; Wang and Nagy, 2008); mientras que el factor de elongación 1 α (eEF1 α) interacciona con el ARN viral inhibiendo su reclutamiento y síntesis (Li *et al.*, 2010; Davis *et al.*, 2007). Por otro lado, existen proteínas transportadoras con actividad ATPasa, de calcio y magnesio (PMR1) o sólo de calcio (ECA1 y 3), que modulan la actividad del complejo replicativo de TBSV y que están implicadas en el proceso de recombinación del ARN viral (Jaag *et al.*, 2010).

Por otro lado, los lípidos constituyen un factor importante en distintas etapas de la infección producida por diferentes virus. Se ha demostrado que proteínas implicadas en remodelación de membranas y síntesis de lípidos, como Erg25 (enzima importante en la síntesis de esteroides), interviene en la formación del CR de tombusvirus (Sharma *et al.*, 2010). Lípidos celulares como los esteroides también se han relacionado con la formación del CR (Sharma *et al.*, 2010; Mackenzie *et al.*, 2007).

Dentro de las proteínas que están relacionadas con síntesis de lípidos se encuentra la proteína Pah1. Es una fosfatasa dependiente de Mg²⁺, cuya fosforilación/desfosforilación regula su actividad y su localización subcelular. Pah1 se localiza en el citosol en estado inactivo, cuando es fosforilada por Pho80/85 se asocia a las membranas del RE donde mediante desfosforilación por Nem1/Spo7 (subunidad catalítica y reguladora, respectivamente) se activa y cataliza la desfosforilación de ácido fosfatídico (PA) para producir diacilglicerol (DAG). El DAG interviene a su vez en la producción de triacilglicéridos (TAG), fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE) (Siniosoglou, 2009). Un esquema de este proceso se puede observar en la Figura 10A. Estos datos sugieren que la proteína Pah1 es muy importante en síntesis y metabolismo de lípidos. En el caso de *S. cerevisiae* la delección del gen que codifica Pah1, provoca una gran expansión de la membrana nuclear y del RE (Siniosoglou, 2009), como se muestra en la Figura 10B. En el laboratorio del Dr. Peter Nagy observaron que la ausencia de Pah1 incrementaba la replicación de TBSV en relación con la cepa *wild type* (wt) (Chuang *et al.*, 2014). Por lo tanto, sería interesante estudiar el CR en cepas de levadura que carecen del gen pah1 para clarificar cual es el papel de dicha proteína, y en definitiva, del RE en la replicación de TBSV.

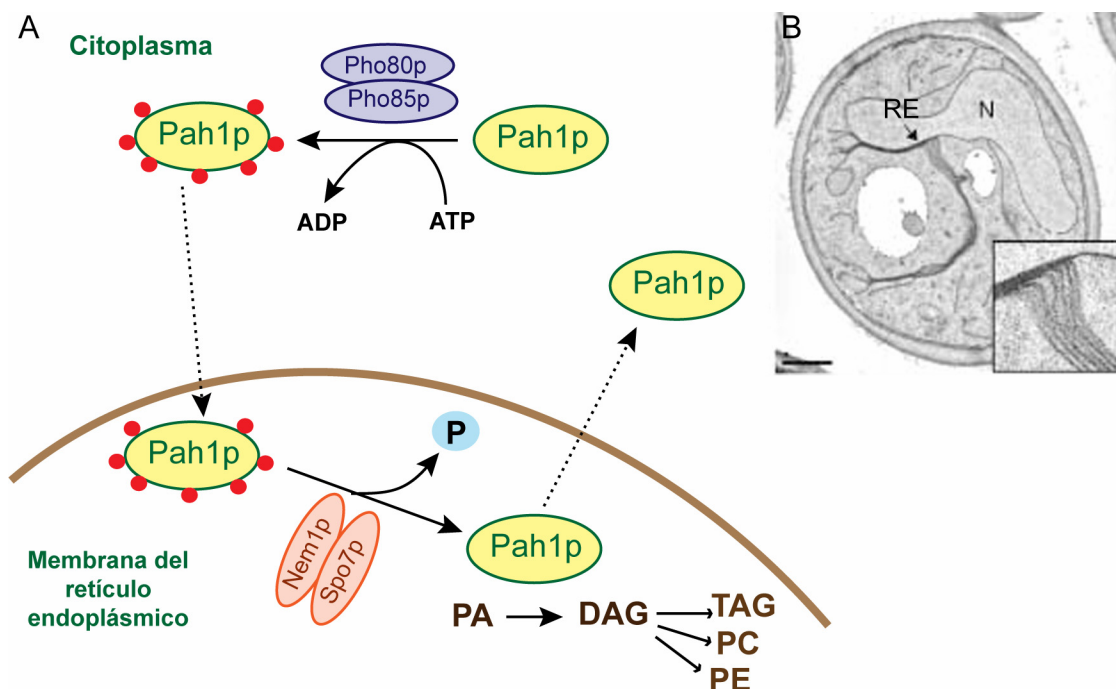


Figura 10. Función de la proteína Pah1 y fenotipo de la cepa $\Delta pah1$ en levaduras

A) La activación y localización subcelular de la proteína Pah1 están regulados por ciclos de fosforilación/desfosforilación. En retículo endoplasmático (RE), Pah1 participa en la síntesis y metabolismo de lípidos. Adenosín difosfato, ADP; Adenosín trifosfato, ATP; Fosfato, P; Ácido fosfatídico, PA; diacilglicerol, DAG; triacilglicéridos, TAG; fosfatidilcolina, PC; fosfatidiletanolamina, PE. B) La delección del gen *pah1* en levaduras *S. cerevisiae* provoca proliferación y expansión de la membrana nuclear y del RE. La imagen a mayor magnificación (abajo a la derecha) muestra la expansión de las membranas del RE. N, núcleo (Siniosoglou, 2009). Barra: 0.5 μ m.

4. Virus Bunyamwera

La familia *Bunyaviridae* contiene alrededor de 350 virus ARN, clasificados en 5 géneros: *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* y *Tospovirus*. Los bunyavirus infectan a una gran variedad de animales y de plantas, causando serias enfermedades en algunos casos. Cuatro de los cinco géneros incluyen miembros que son los agentes causantes de fiebres hemorrágicas, para las cuales no existen tratamientos preventivos ni efectivos. Además, muchos bunyavirus están clasificados como patógenos emergentes debido a su incidencia en nuevos hospedadores e incremento en su distribución geográfica (Walter and Barr, 2011). El género *Orthobunyavirus* incluye el virus Bunyamwera (VBUN), aislado de mosquitos del género *Aedes* en el bosque Semliki (Uganda) en 1943 (Smithburn *et al.*, 1946) y prototipo dentro de los bunyavirus. Los *Orthobunyavirus* son arbovirus y se transmiten por la picadura de un insecto artrópodo vector, concretamente mosquitos de la familia *Culicidae* y de los géneros *Aedes*, *Culex* o *Anopheles*. Los hospedadores son pequeños mamíferos silvestres como ardillas u otros roedores (Beaty and Bishop, 1988).

4.1. Morfología y genoma viral

El VBUN es un virus con envuelta y simetría icosaédrica que presenta un diámetro de entre 80 y 120 nm. En su superficie se exponen las glicoproteínas virales que forman las espículas o *spikes*.

Todos los miembros del género *Orthobunyavirus* son virus ssRNA (-), que poseen un genoma constituido por tres segmentos denominados: L (*large*), M (*medium*) y S (*small*), haciendo referencia a su longitud. La organización de los segmentos del genoma es similar entre los distintos miembros del género, poseen regiones no codificantes en los extremos 3' y 5', flanqueando la región codificante (Walter and Barr, 2011). El segmento L codifica la proteína L, es la ARN polimerasa ARN dependiente; el segmento M codifica las dos glicoproteínas virales Gn y Gc, y la proteína no estructural NSm; y el segmento S codifica la nucleoproteína N y la proteína no estructural NSs. En la Figura 11 se puede observar un esquema del virión (A), así como un modelo 3D obtenido mediante microscopía electrónica (B) y una imagen de MET del VBUN (C). Además, en la Figura 11D se muestra la organización del genoma viral, con las proteínas que codifica cada segmento.

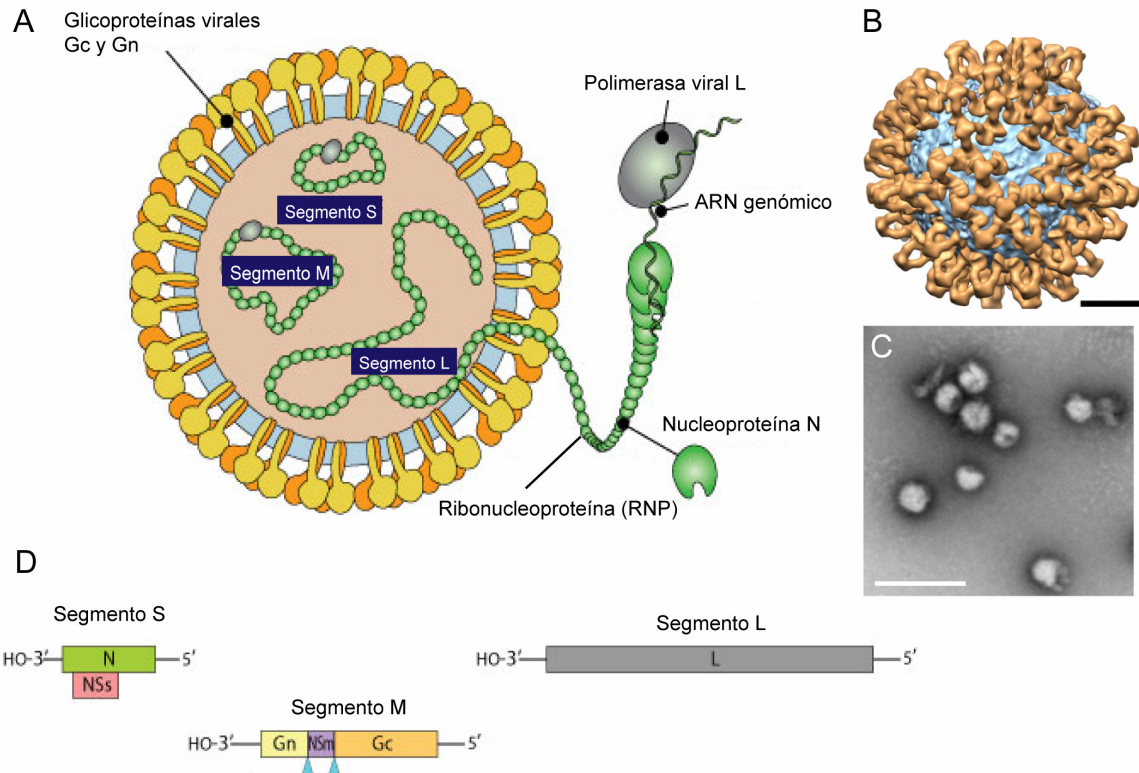


Figura 11. Estructura, proteínas y genoma del VBUN

A) Esquema de la estructura del VBUN. Se muestran las glicoproteínas virales (Gc y Gn), la polimerasa (L), las proteínas de la nucleocápsida o nucleoproteína (N), las ribonucleoproteínas (RNPs) y los tres segmentos genómicos S, M y L. B) Tomografía electrónica y reconstrucción 3D del VBUN. Barra de 25 nm. Obtenido de Bowden *et al.*, 2013. C) MET de VBUN purificados. Barra de 200 nm. D) Segmentos del genoma del VBUN. El genoma del VBUN está compuesto por tres segmentos de ssRNA (-). El segmento S codifica la proteína de la nucleocápsida N y la proteína no estructural NSs, el segmento M codifica las glicoproteínas Gn y Gc y la proteína no estructural NSm, y el segmento L codifica la polimerasa viral L. Modificado de http://viralzone.expasy.org/all_by_species/82.html.

4.2. Proteínas virales

-Polimerasa viral L

Es una ARN polimerasa ARN dependiente de elevado peso molecular (200 kDa) y constituye la subunidad catalítica para la síntesis de ARN durante la transcripción y la replicación.

Utilizando genética reversa, se insertó el marcador V5 en la proteína L, para determinar mediante inmunofluorescencia la localización de la polimerasa. En células infectadas se observó que la polimerasa L tiene distribución citoplasmática, concentrándose en la zona perinuclear de la célula (Shi and Elliott, 2009). Además, estudios de fraccionamiento celular y microscopía electrónica, demostraron que la proteína se asocia con membranas intracelulares (Fontana *et al.*, 2008). Mediante ensayos de inmunoprecipitación e inmunofluorescencia, se demostró que la polimerasa L interacciona con la nucleoproteína N y que ambas proteínas colocalizan en células infectadas.

-Proteínas Gn y Gc

Las glicoproteínas virales Gn (31 kDa) y Gc (128 kDa) son proteínas integrales de membrana de tipo I, modificadas por N-glicosidación del aminoácido asparagina (N) (Shi *et al.*, 2005; Salanueva *et al.*, 2003; Schmaljohn, 2001). Se sintetizan a partir de un polipéptido precursor codificado por el segmento M y que por procesamiento proteolítico da lugar a las dos glicoproteínas y a la proteína no estructural NSm. Las glicoproteínas virales se caracterizan por ser ricas en residuos cisteína, la mayoría de los cuales, están en posiciones conservadas y permiten la formación de puentes disulfuro. Se ha demostrado que Gc y Gn forman heterodímeros en el RE (Shi *et al.*, 2005), aunque su localización mayoritaria es en el aparato de Golgi, donde se dan las modificaciones post-traduccionales y donde se incorporan a los viriones. La señal de retención en el Golgi está en el dominio transmembrana de Gn. Por lo tanto, Gc

necesita asociarse con Gn para salir del RE, plegarse correctamente y transportarse al Golgi (Lappin *et al.*, 1994).

Existen tres puntos de glicosidación, residuo N en posición 60 en Gn y residuos N624 y N1169 en Gc. Aunque la glicosidación en el residuo N624 de Gc sólo está conservada en el serogrupo Bunyamwera (Briese *et al.*, 2004). Dicho proceso altamente conservado, indica que los N-glicanos son claves para la función de las glicoproteínas. Además se ha observado, que la supresión de la glicosidación implica plegamiento erróneo de las proteínas y su retención en el RE.

-Proteína no estructural NSm

La proteína no estructural NSm presenta un peso molecular de 16 kDa y está codificada por el segmento M. Es una proteína integral con tres dominios transmembrana (Elliott, 1990). En células infectadas se ha visto que la proteína se localiza en el Golgi, e interacciona con la glicoproteína Gn a través del extremo C terminal.

No se conoce bien la función de NSm, pero podría desempeñar un papel importante en ensamblaje y morfogénesis viral, debido a su acumulación en el Golgi, donde se da la maduración de las partículas virales (Fontana *et al.*, 2008). Además, se comporta como una proteína de andamiaje o *scaffolding*, está presente en los CRs y en los virus inmaduros, desapareciendo en los viriones maduros. Este comportamiento se ha observado en otras proteínas implicadas en morfogénesis viral (Steven *et al.*, 2005).

Por otro lado, en trabajos recientes del laboratorio (López-Montero, resultados no publicados), se ha relacionado a la proteína NSm con regulación negativa de la infección por VBUN. Se observó que al infectar con mutantes que presentaban delecciones parciales de la proteína, la infección cursaba más rápidamente y era más citotóxica.

-Nucleoproteína N

El segmento S codifica para la proteína de la nucleocápside o nucleoproteína N (23 kDa), cuya principal función es interaccionar con el ARN viral formando las RNPs, encapsidando el genoma viral. El análisis estequiométrico de las RNPs reveló que la proteína N se une en forma monomérica cada 12 nucleótidos (Mohl and Barr, 2009). Además, en posición 94 existe una arginina altamente conservada, esencial para la unión del ARN. También contribuyen a la unión la arginina en posición 40 y la lisina en posición 50 (Walter *et al.*, 2011).

Además de proteger el ARN viral de la degradación por parte del sistema inmune del huésped, interacciona consigo misma formando oligómeros, con la polimerasa viral L, y con la región carboxi terminal de las glicoproteínas virales, estabilizando la estructura del virión. Por otro lado, también interacciona con proteínas del huésped, como la proteína de unión a poli A (*poly A binding protein*, PABP). La proteína N también podría desempeñar una función importante en la regulación de la actividad de la polimerasa viral (Shi *et al.*, 2005).

-Proteína no estructural NSs

La mayoría de los miembros del género *Orthobunyavirus* codifican la proteína no estructural NSs de 13 kDa, a partir de una pauta de lectura abierta u ORF solapante en el segmento S. Mediante inmunofluorescencia se determinó que NSs se distribuía en el núcleo y en gránulos en el citoplasma (Thomas *et al.*, 2004).

Existen estudios que demuestran que NSs desempeña importantes funciones en replicación viral y, además, interacciona con proteínas del huésped. Mediante un sistema de minireplicones, se observó que la proteína NSs actuaba como regulador negativo de la polimerasa durante la replicación viral (Weber *et al.*, 2001). Por otro lado, es un factor de virulencia antagonista de interferón (IFN) (Bridgen *et al.*, 2001). Inhibe la transcripción por parte de la ARN polimerasa ADN dependiente (ARN polimerasa II, ARNP_{II}) de ARNm celulares. Este hecho, inhibe el promotor del IFN- β , previniendo así la activación de la respuesta inmune innata. Por lo tanto, NSs contribuye fuertemente a la inhibición de producción de proteínas de la célula huésped, a nivel de transcripción y traducción. Pero su principal función parece ser la inhibición del IFN de tipo I en células de mamífero, incrementando así el número de virus en sangre.

4.3. Ciclo de replicación viral

La entrada del VBUN en la célula huésped está mediada por la interacción de una o las dos glicoproteínas virales con receptores en la superficie celular. Aunque el receptor no ha sido identificado para ningún orthobunyavirus, parece que el proceso inicial en la unión del virus depende de una o más moléculas de ubiquitina en la superficie celular. Tras la entrada en la célula mediada por las glicoproteínas virales, el virus es internalizado por endocitosis dentro de vesículas de clatrina. En la Figura 12 se muestra un esquema del ciclo de replicación del VBUN.

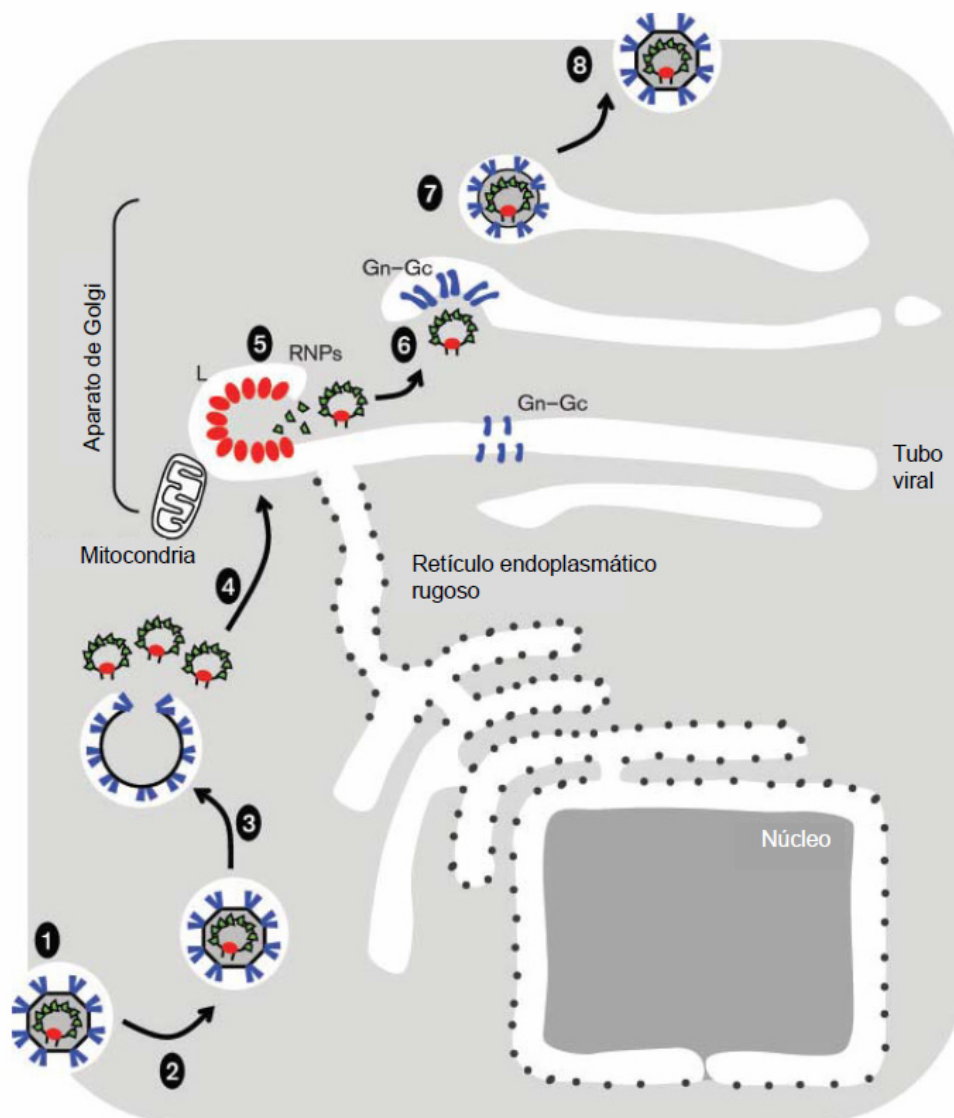


Figura 12. Modelo de la entrada, ensamblaje y salida del VBUN

La entrada se produce principalmente por endocitosis (1), después el virus pasa a través de endosomas tempranos y tardíos (2), y las RNPs son liberadas al citoplasma por acidificación del pH del endosoma tardío (3) para acumularse en el aparato de Golgi (4). Tubos virales (5) que contienen factores celulares y virales se forman a partir del Golgi, y están conectados a mitocondrias y a RER. En el dominio globular del tubo, se concentra la polimerasa viral L (óvalos de color rojo). Las RNPs se asocian con los heterodímeros formados por las glicoproteínas virales Gn y Gc (6) que se acumulan en el Golgi. Los heterodímeros Gn-Gc son modificados en el *trans*-Golgi por glicosidación (7), produciéndose los cambios conformacionales y la maduración de las partículas virales. Los virus son transportados en vesículas hasta la membrana plasmática para ser liberados (8). Modificado de Walter and Barr, 2011.

La liberación del genoma viral y de la polimerasa L al citoplasma se produce por acidificación de las vesículas en las que se encuentra. A continuación tiene lugar la transcripción de los segmentos del genoma viral por la proteína L, produciendo los ARNm. En esta primera etapa de transcripción, se usan como cebadores oligonucleótidos presentes en el extremo 5' de

ARNm celulares, generados por la actividad endonucleasa de la proteína L (Jin and Elliott, 1993).

Las proteínas virales se sintetizan rápidamente, traduciendo los ARNm de los segmentos S y L en ribosomas libres presentes en el citoplasma, y el M a partir de ribosomas unidos al RE. Una vez sintetizadas Gc y Gn se dirigen al aparato de Golgi, pero es necesaria la interacción en RE de las dos glicoproteínas para su transporte eficiente a las membranas del Golgi (Lappin *et al.*, 1994).

Para la replicación del genoma ARN de polaridad negativa es necesario la síntesis del antígeno o el ARN de polaridad positiva complementario. Esta molécula difiere de los ARNm de polaridad positiva en que no tiene la extensión del cebador en el 5' y el extremo 3' se extiende hasta el 5' terminal del ARN genómico. En la Figura 13 se muestra un esquema de los procesos de transcripción y replicación. Solamente las proteínas L y N son requeridas para la replicación (Dunn *et al.*, 1995). No se conoce cual es el factor implicado en el paso de transcripción a replicación, pero como en otros virus ARN de polaridad negativa, probablemente, el nivel de proteína N sintetizada desempeña este papel. Además, existen dos diferencias entre los procesos de transcripción y replicación: el requerimiento de un cebador para la iniciación y el reconocimiento de una señal de terminación en el ARNm. Podrían existir diferentes formas de la polimerasa, a través de su interacción con proteínas celulares, que explicarían los distintos modelos de producción de ARN. Las señales de la encapsidación del ARN viral se han localizado en los extremos 3' y 5' (Lowen and Elliott, 2005). Análisis de mutaciones de estas regiones del VBUN revelaron la presencia de una secuencia conservada de entre 20-33 nucleótidos en el extremo 5' del ARN viral, necesaria para el empaquetamiento (Kohl *et al.*, 2006).

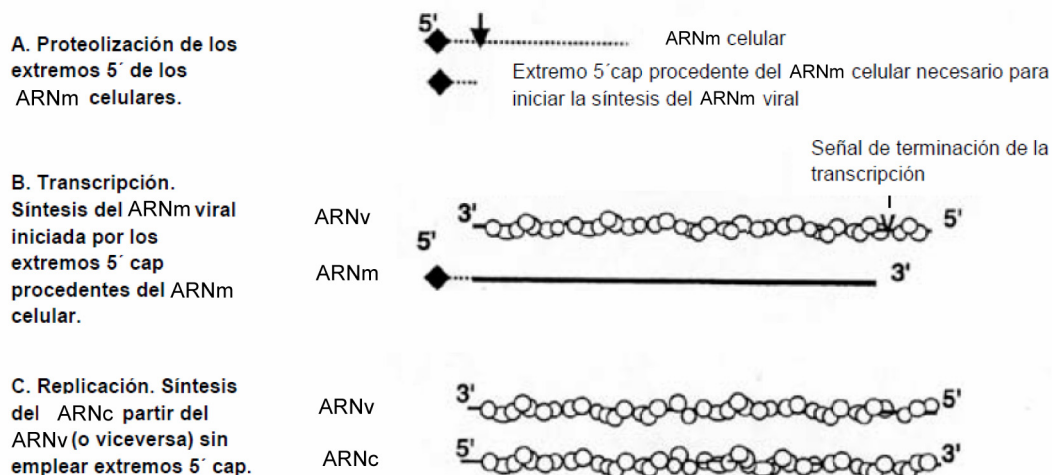


Figura 13. Transcripción y replicación del VBUN

A) La transcripción del ARNm viral comienza con la proteólisis del extremo 5' de los ARNm celulares. B) Los cebadores generados en A sirven para iniciar la síntesis del ARNm viral. Existe una señal de terminación de la transcripción (V) en el ARN viral (ARNv) cerca del extremo 5'. C) La replicación del ARNv para generar ARN complementario (ARNc) (o del ARNc a ARNv) es independiente del extremo 5' cap procedente del ARNm celular. Modificado de Schmaljohn, 2007.

4.4. Ensamblaje y morfogénesis viral

Durante la infección por VBUN tiene lugar el reclutamiento de orgánulos celulares, concretamente, mitocondrias y RER alrededor del aparato de Golgi, formando la factoría viral (Salanueva *et al.*, 2003). En la Figura 14A se puede apreciar por microscopía confocal la reorganización de orgánulos celulares a la zona perinuclear, constituyendo la factoría viral. Además, estudios de microscopía electrónica mostraron el reclutamiento de orgánulos en células infectadas por VBUN (Figura 14C). El ensamblaje del VBUN tiene lugar en el aparato de Golgi, en cuyas membranas, se acumulan las glicoproteínas virales. Además, el extremo N-terminal de NSm es requerido para el ensamblaje de los nuevos viriones.

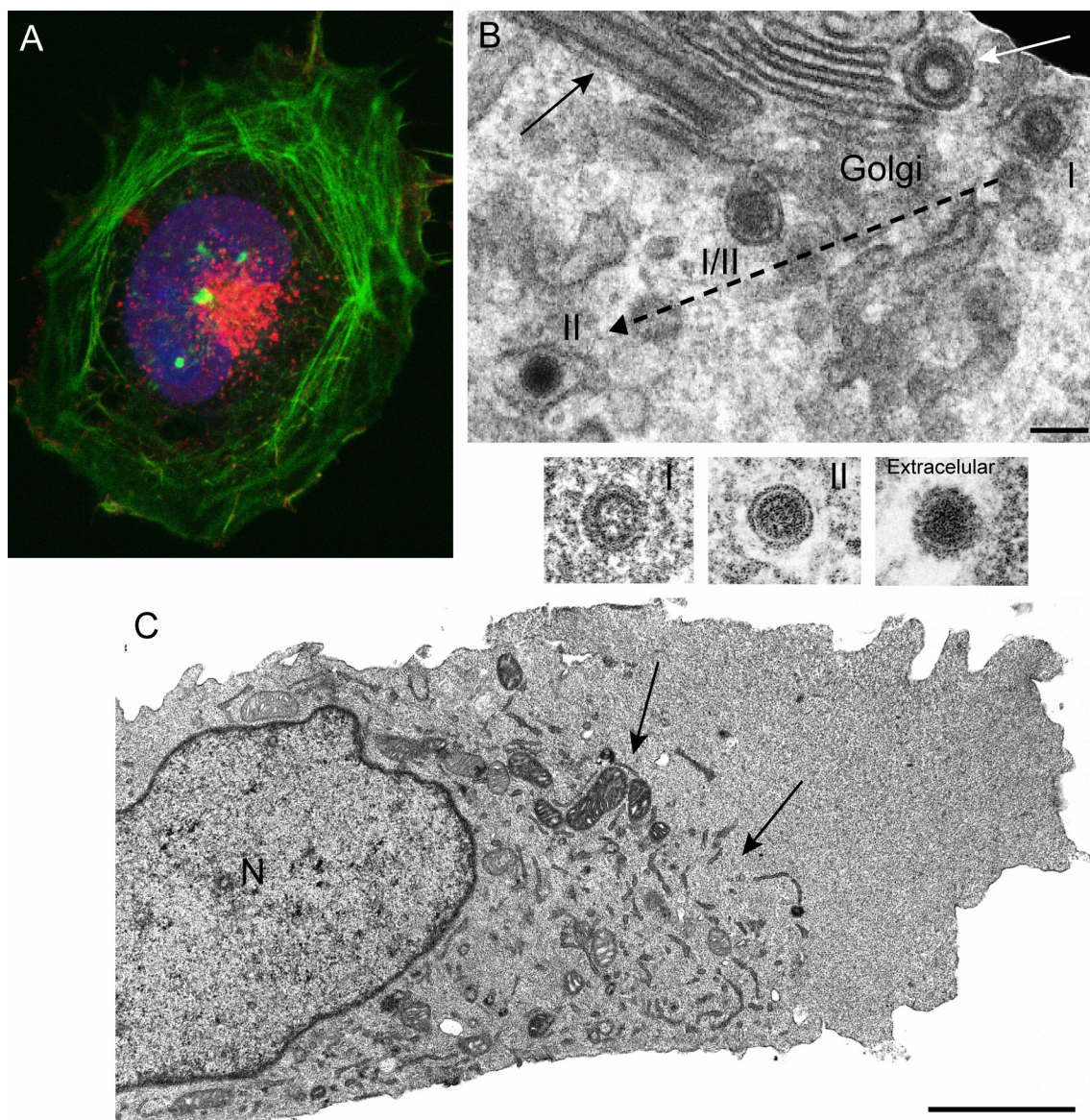


Figura 14. Reclutamiento de orgánulos celulares en células infectadas y morfogénesis viral

A) Microscopía de fluorescencia de una célula de mamífero infectada por el VBUN. Acumulación de proteína viral Gc en zona perinuclear, marcando la factoría viral. Obtenido de Fontana *et al.*, 2008. B) Microscopía electrónica de transmisión (MET) de la ruta morfogenética de VBUN en células de mamífero. Transformación de los intermediarios de maduración a lo largo del *cis* y *trans* Golgi. Las flechas apuntan al CR ensamblado en el Golgi, dominio globular (flecha blanca) y tubo (flecha negra). Imágenes de los virus intracelulares de tipo I y II y de un virus extracelular (Salanueva *et al.*, 2003). C) MET de célula de mamífero infectada por VBUN. Se observa el reclutamiento de orgánulos celulares a la zona perinuclear. Barras: 100 nm en B; 1 μ m en C.

Se describieron dos intermediarios de maduración mediante microscopía electrónica, virus intracelular anular o de tipo I (via) y virus intracelular denso o de tipo II (vid), debido a las densidades electrónicas que mostraban en secciones (Salanueva *et al.*, 2003) (Figura 14B). Además, se establecieron dos puntos clave en el proceso de maduración. El primero tiene lugar en las membranas del *trans*-Golgi (Figura 14B), en donde los virus intracelulares de tipo I se

transforman en los de tipo II, mediante la adquisición de azúcares complejos por N-glicosidación de las glicoproteínas virales. El segundo cambio estructural se produce a nivel de la membrana plasmática durante la salida de los virus de la célula, mediante el ensamblaje de las espículas de la envuelta características de los virus extracelulares (Novoa *et al.*, 2005a).

En el interior de las factorías virales se identificó el CR de VBUN. Se observaron estructuras con dos partes diferenciadas: dominio globular o esférula y un dominio tubular (Salanueva *et al.*, 2003). El CR se ensambla en las membranas del Golgi y, frecuentemente, está abierto al citoplasma. Además, se observaron conexiones entre los tubos virales y orgánulos celulares como mitocondrias y RER. Dentro de los tubos virales se encontraron proteínas virales; como la polimerasa viral L que se concentra en los dominios globulares. La proteína NSm se encontró en los tubos virales y en los virus intracelulares, pero no en los extracelulares, lo que indica que podría ser una proteína de andamiaje. Además, se encontraron proteínas celulares como actina, tubulina, proteínas ribosomales, el factor de elongación II de la traducción eucariota, la proteína del Retinoblastoma y miosina-9 o cadena pesada de la miosina no muscular (NMHC-IIA, *non muscle myosin II-A heavy chain*) (Fontana *et al.*, 2008). Los contactos con orgánulos celulares y la presencia de proteínas del huésped dentro de los tubos virales, sugieren que quizás dichos tubos actúen como estructuras de comunicación, aportando los factores necesarios para la replicación viral, pero también manteniendo los orgánulos unidos a la factoría.

Se ha propuesto un modelo en el que las RNPs son transportadas desde los sitios de replicación en los dominios globulares hasta los sitios de ensamblaje en las membranas del Golgi modificadas por la inserción de Gn y Gc, promoviendo la formación de las partículas virales mediante gemación o *budding* (Fontana *et al.*, 2008). Posteriormente, vesículas que contienen las partículas virales son transportadas a la superficie celular mediante la ruta exocítica. En la Figura 15 se puede observar un esquema de este modelo.

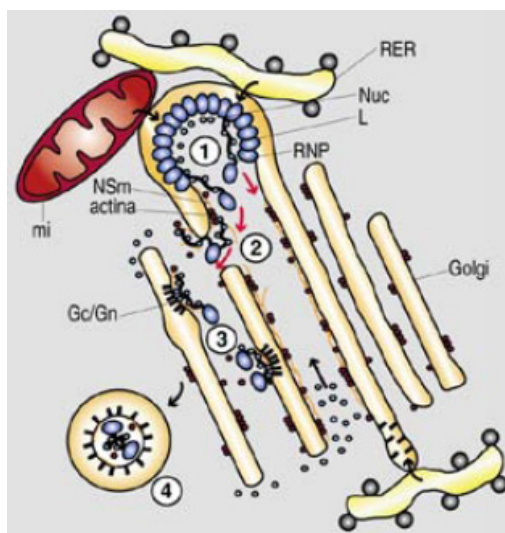


Figura 15. Modelo del funcionamiento de los tubos virales en la factoría de VBUN en células de mamífero

1) Síntesis del ARN viral y formación de las RNPs en las esférulas de los tubos virales. 2) Transporte de las RNPs a los sitios de ensamblaje. 3) Formación de los arcos de maduración que generarán los nuevos virus. 4) Partícula viral lista para los procesos de maduración y secreción. L, polimerasa viral; RNP, ribonucleoproteína; Nuc, nucleocápsida; Gc/Gn, glicoproteínas virales; NSm, proteína no estructural codificada por el segmento M; RER, retículo endoplasmático rugoso; mi, mitocondria. Modificado de Fontana *et al.*, 2008.

4.5. Proteínas celulares implicadas en reclutamiento de orgánulos y transporte de RNPs

La expresión de las polimerasas virales y el ensamblaje del CR es generalmente suficiente para el reclutamiento de orgánulos celulares (Fontana *et al.*, 2007). Como se ha mencionado en apartados anteriores, en muchas factorías virales se produce el reclutamiento de mitocondrias. Podrían estar implicadas en el aporte energético durante la replicación viral. Sin embargo, en ciertos casos también actúan como orgánulo de replicación (Kopek *et al.*, 2007) o como sitio de ensamblaje (Lanman *et al.*, 2008; Garzon *et al.*, 1990). Además, estudios recientes indican que las mitocondrias pueden aportar factores o proteínas celulares importantes para la replicación viral.

Entre dichos factores, está la proteína p32 que aunque se localiza principalmente en la matriz mitocondrial, también se encuentra en el núcleo y en la membrana plasmática. P32 es una proteína altamente conservada en la evolución que interacciona con distintas proteínas celulares desempeñando diversas funciones; por ejemplo, interacciona con factor de *splicing* 2 (*splicing factor* 2, SF2) o con la proteína pro-apoptótica Hrk. También interacciona con proteínas virales como la proteína del core del VHC o con la proteína Rev del VIH. Por otro lado, participa en muchas rutas de señalización apoptóticas (Itahana and Zhang, 2008). Además, p32 se ha relacionado con distintos virus ARN. Por ejemplo en células infectadas por VRUB, p32 sale de las mitocondrias y se concentra en los orgánulos de replicación (Ilkow *et al.*, 2010; Fontana *et al.*, 2007). La proteína se detectó en las membranas de dichos orgánulos de replicación, donde también se encontraban las polimerasas y el ARN viral (Fontana *et al.*, 2010). Además, participa

en el reclutamiento de mitocondrias e interacciona con la proteína de la cápsida de VRUB incrementando la replicación viral, mediante un mecanismo que no se conoce todavía (Claus *et al.*, 2011). De hecho, la transcripción del ARN subgenómico de VRUB parece depender de la interacción de p32 con la proteína de la cápsida (Beatch *et al.*, 2005; Mohan *et al.*, 2002). Por otro lado, p32 interacciona con proteínas de otros virus facilitando la replicación viral, como por ejemplo con proteínas del VIH, VHS, adenovirus, Epstein-Bar y VHC (Ghebrehiwet *et al.*, 2001).

Otra proteína que podría estar implicada en la señalización para el reclutamiento de mitocondrias es la mitofusina-2 (Mfn-2), proteína transmembrana con función GTPasa presente en la membrana mitocondrial externa. Mfn-2 media de manera independiente del citoesqueleto los procesos de fusión y fisión de las mitocondrias. La fusión de mitocondrias tiene lugar en muchos tipos celulares, constituyendo un paso importante que determina la morfología mitocondrial. Además, Mfn-2 también se localiza en la membrana del RE; la pérdida de Mfn-2 altera la morfología del RE, y reduce considerablemente los contactos RE-mitocondria. Estos resultados sugieren que Mfn-2 desempeña un importante papel en la unión del RE con la mitocondria (Cosson *et al.*, 2012). En relación con las infecciones virales, se ha observado que la proteína Vpr del VIH induce muerte celular al incrementar la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa. El daño que se producía durante la infección viral estaba relacionado con una reducción de la expresión de Mfn-2 (Huang *et al.*, 2012). Por otro lado, la respuesta inmune innata frente a las infecciones virales implica la activación de distintas rutas de señalización que terminan con la producción de interferón de tipo 1 (IFN-1). En este proceso juega un papel importante la *mitochondrial antiviral signaling* (MAVS), proteína adaptadora de la membrana mitocondrial externa. Se ha demostrado que Mfn-2 interacciona con MAVS modulando la respuesta inmune antiviral (Yasukawa *et al.*, 2009). Además, la sobreexpresión de Mfn-2 en células de mamífero provoca la agregación de mitocondrias en la zona perinuclear, de forma dependiente del dominio C terminal de la proteína (Rojo *et al.*, 2002). Se demostró que esta función no estaba mediada por el citoesqueleto. La agregación de mitocondrias observada es muy semejante a la que tiene lugar durante las infecciones virales; por ello, sería interesante estudiar el posible papel de Mfn-2 en el reclutamiento de mitocondrias para la formación de la factoría viral.

Dentro de las factorías virales tiene que existir algún sistema de transporte para el movimiento efectivo de macromoléculas virales y celulares. Ciertas proteínas o factores podrían regular el transporte del genoma viral recién sintetizado hasta los sitios de ensamblaje. Fontana y colaboradores demostraron que dentro del CR de VBUN había proteínas celulares como actina y miosina-9 o NMHC-IIA (Fontana *et al.*, 2008), como se indicó en el apartado anterior. NMHC-

IIA está compuesta por dos cadenas pesadas y dos ligeras. Cada cadena pesada presenta dos partes diferenciadas: un dominio globular o cabeza en el extremo amino terminal con actividad ATPasa, a través del cual interacciona con la actina, y una cola en α -hélice en el extremo carboxi terminal. Las cadenas ligeras, se disponen en el cuello o punto de unión entre la cabeza y la cola, y podrían estar implicadas en regulación de la interacción actina-miosina y de la actividad ATPasa. En base a la función de miosina en la célula y de su presencia en el CR de VBUN, NMHC-IIA podría ser importante en el transporte de las RNPs desde el sitio de replicación hasta los lugares de ensamblaje. Además, la miosina se ha asociado con otras infecciones virales; por ejemplo, durante la infección por VHS, la miosina Va parece desempeñar un papel importante, ya que su nivel de expresión se incrementa con la infección viral. También demostraron que la proteína estaba implicada en el transporte de virus al espacio extracelular, y encontraron colocalización entre la miosina Va y un marcador del *trans*-Golgi o TGN (TGN-38) (Roberts and Baines, 2010). Por otro lado, se ha descrito que NMHC-IIA actúa como receptor para la entrada del VHS en células de mamífero. Parece que esta proteína es esencial para la interacción efectiva del virus con la célula a través de las glicoproteínas virales, y para la entrada en la célula (Arii *et al.*, 2010). Durante la infección por VV la proteína viral F11 inhibe la ruta de señalización de Rho GTPasa, facilitando la migración y dispersión del virus (Handa *et al.*, 2013). En ausencia de miosina-9A, la ruta de señalización Rho no es inhibida, lo que conlleva a una menor liberación de virus y disminución de las colas de actina. Estos datos demuestran la importancia del citoesqueleto, y en concreto del sistema actina-miosina, en el movimiento y transporte de virus. Por extensión, este sistema de transporte también podría ser utilizado por los virus para el movimiento eficaz de componentes dentro de la factoría viral.

Hasta el momento, la única ruta de señalización implicada en formación de las factorías virales que ha sido identificada es la de los agregosomas, utilizados por virus ADN como ASFV, poxvirus e iridovirus frog virus 3 (Novoa *et al.*, 2005b; Rojo *et al.*, 1998). El agregosoma es una respuesta celular frente al plegamiento defectuoso y a la agregación de las proteínas (Kopito, 2000). Los agregosomas se ensamblan en el centro organizador de microtúbulos (COMT), reclutan chaperonas celulares y mitocondrias, y construyen una caja de filamentos de vimentina, estructura que es mantenida por la actividad de dineínas sobre microtúbulos (Netherton and Wileman, 2011). Herpesvirus, adenovirus, y SV-40 ensamblan unas estructuras semejantes a los agregosomas, denominadas cuerpos nucleares de la leucemia promielocítica o PML-NB, como sitios donde se forman las factorías virales (Maul *et al.*, 2000). Sin embargo, trabajos recientes sugieren que deben participar elementos adicionales en la biogénesis de las factorías nucleares de poliomavirus (Erickson *et al.*, 2012). Se ha propuesto que los virus utilizan la ruta de los agregosomas para concentrar los factores necesarios para la replicación y morfogénesis virales, y

para evitar ser reconocidos por el sistema de defensa de la célula. Alternativamente, los complejos macromoleculares virales podrían ser reconocidos por la célula como proteínas no plegadas, activándose la respuesta de formación del agregosoma (Netherton and Wileman, 2011).

5. Reovirus

Los reovirus pertenecen a la familia *Reoviridae* cuyos miembros infectan un amplio rango de organismos, incluyendo mamíferos, aves, insectos y plantas (Dermody, 2013). La familia *Reoviridae* incluye patógenos como los rotavirus, son los agentes que causan con más frecuencia diarreas en niños (Parashar *et al.*, 1998), o los orbivirus, económicamente importantes por ser un patógeno común de ganado y caballos (Coetzee *et al.*, 2012). Actualmente tres serotipos de reovirus circulan entre humanos y otros mamíferos: T1, T2 y T3. Los serotipos se distinguen en la neutralización de la infección mediada por anticuerpos, y en la inhibición de la hemaglutinación. Cada serotipo está representado por una cepa prototipo aislada a partir de humanos: tipo 1 Lang (T1L), tipo 2 Jones (T2J), y tipo 3 Dearing (T3D). Dichas cepas difieren en el tropismo celular, mecanismos de muerte celular, formas de diseminación e infección del sistema nervioso central (SNC). Los reovirus constituyen un importante modelo para estudiar la patogenia viral. Estudios de reovirus con diseminación neural han aportado información relevante sobre los mecanismos mediante los cuales los virus causan infección en el SNC. Además, la reciente identificación de nuevos factores virales y celulares implicados en diseminación de reovirus a través de la sangre, también ha contribuido al estudio de la enfermedad causada por el virus.

5.1. Morfología viral

Los reovirus son virus sin envuelta y con simetría icosaédrica. La partícula viral posee unos 80 nm de diámetro y contiene dos cápsidas concéntricas, la interna y la externa. La cápsida externa presenta simetría icosaédrica T=13, mientras que la cápsida interna tiene simetría icosaédrica T=2. En la Figura 16 se muestra un esquema de la estructura de reovirus (A), reconstrucción del virión por criomicroscopía electrónica (B) e imagen de MET de una tinción negativa de rotavirus (C).

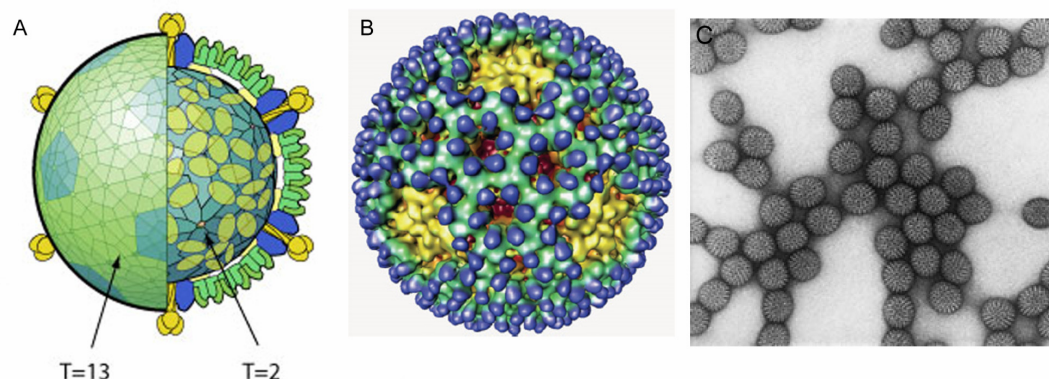


Figura 16. Esquema del virión de reovirus

A) Representación del virión de reovirus constituido por una doble cápsida. La cápsida interna presenta simetría icosaédrica $T=2$, mientras que la cápsida externa posee simetría icosaédrica $T=13$. Modificado de http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/104.html. B) Reconstrucción del virión de reovirus obtenida mediante criomicroscopía electrónica (Nason *et al.*, 2001). C) MET de tinción negativa de rotavirus. Los virus tienen un diámetro aproximado de 80 nm. Obtenido de: <http://techalive.mtu.edu/meec/module02/Viruses.htm>.

5.2. Genoma y proteínas virales

El genoma de reovirus consiste en 10 segmentos de dsRNA, dichos segmentos se denominan en base a su longitud: tres segmentos largos (L1, L2, L3), tres medianos (M1, M2, M3) y cuatro pequeños (S1, S2, S3, S4). Los segmentos de dsRNA se empaquetan siguiendo una relación estequiométrica de 1 segmento de cada tipo por virión. Los segmentos de reovirus son monocistrónicos, excepto M3 y S1. En la Figura 17 se muestra un esquema del genoma de reovirus, así como de la organización del virión (Boehme *et al.*, 2013). Las proteínas de reovirus se denominan en función de los segmentos que las codifican: *lambda* (λ) para L, *mu* (μ) para M, y *sigma* (σ) para S.

La cápsida externa de reovirus está constituida por heterohexámeros de la proteína $\mu 1$ (codificada por M2) y la proteína $\sigma 3$ (codificada por S4). En cada uno de los cinco ejes de simetría, la proteína de unión $\sigma 1$ (codificada por S1) se extiende desde las estructuras formadas por pentámeros de la proteína $\lambda 2$ (codificada por L2). La cápsida interna está constituida por dímeros asimétricos de la proteína $\lambda 1$ (codificada por L3), que están estabilizados por la proteína $\sigma 2$ (codificada por S2). Las proteínas $\lambda 3$ (codificada por L1) y $\mu 2$ (codificada por M1) están ancladas a la cara interna del core mediante interacciones con $\lambda 1$. Por lo tanto, la doble cápsida de reovirus está compuesta por ocho proteínas estructurales: $\lambda 1$, $\lambda 2$, $\lambda 3$, $\mu 1$, $\mu 2$, $\sigma 1$, $\sigma 2$ y $\sigma 3$. Además, el segmento M3 codifica la proteína no estructural μNS , el segmento S3 codifica la proteína no estructural σNS , y el segmento S1 codifica la proteína no estructural $\sigma 1s$. La ARN polimerasa ARN dependiente de reovirus está compuesta por dos subunidades, $\lambda 3$ y $\mu 2$. La

proteína $\lambda 3$ constituye la subunidad catalítica (Tao *et al.*, 2002; Starnes and Joklik, 1993), pero numerosos estudios genéticos, estructurales y bioquímicos indican que la proteína $\mu 2$ se encuentra muy cerca de $\lambda 3$, formando una de las subunidades del complejo de la polimerasa (Kim *et al.*, 2004). En la Figura 17 se puede apreciar un esquema de la organización del genoma de reovirus (A) y de las proteínas del virus dentro del virión (B).

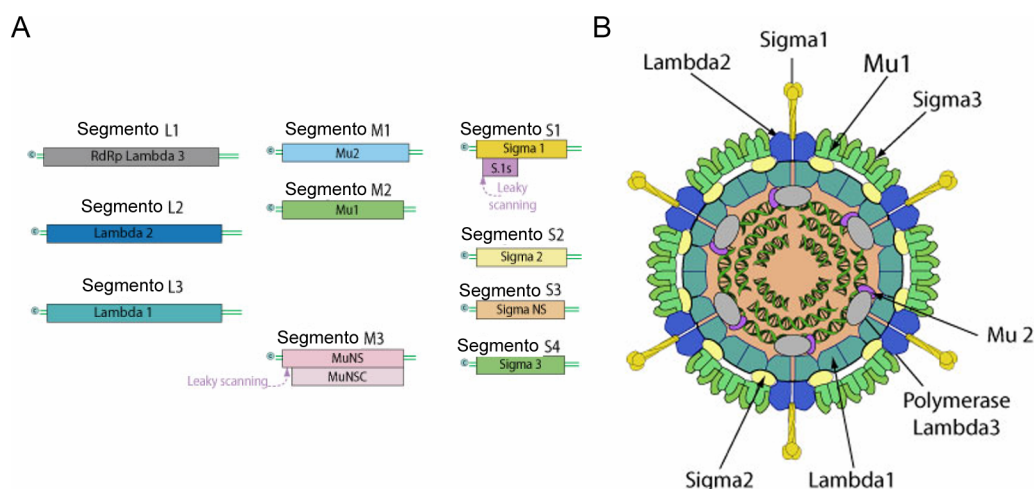


Figura 17. Esquema del genoma de reovirus y organización del virión

A) Genoma de reovirus constituido por 10 segmentos de dsRNA: L1, L2, L3, M1, M2, M3, S1, S2, S3 y S4, que codifican 12 proteínas. B) Organización de las proteínas de la doble cápsida y del genoma dentro del virión. La cápsida externa está constituida por las proteínas *lambda 2*, *sigma 1*, *mu 1* y *sigma 3*. La cápsida interna está formada por *sigma 2* y *lambda 1*. Modificado de http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/105.html.

5.3. Ciclo de replicación viral

La entrada de reovirus en la célula huésped está mediada por el anclaje de la proteína $\sigma 1$ a los receptores de la superficie celular. La proteína $\sigma 1$ posee tres dominios estructurales: en el extremo amino terminal posee una cola de α -hélice, una zona central con estructura de lámina β , y un dominio globular en el extremo carboxi terminal (Reiter *et al.*, 2011; Chappell *et al.*, 2002). En el serotipo T3 de reovirus, la proteína $\sigma 1$ se une a dos tipos de receptores: de ácido siálico (*α -linked sialic acid*, SA) (Dermody *et al.*, 1990) y de moléculas de adhesión de tipo A (*junctional adhesion molecule-A*, JAM-A) (Barton *et al.*, 2001). Ciertos aminoácidos en la zona central de reovirus T3 $\sigma 1$ se unen a SA (Reiter *et al.*, 2011; Chappell *et al.*, 2000), mientras que secuencias en el dominio globular de $\sigma 1$ interaccionan con JAM-A (Barton *et al.*, 2001).

Después de la unión con receptores de la superficie celular, los viriones son internalizados en endosomas a través de un proceso dependiente de $\beta 1$ integrinas (Maginnis *et*

al., 2006) y distribuidos a orgánulos celulares marcados por Rab7 y Rab9, donde tiene lugar el desensamblaje o pérdida de la cápsida (Mainou and Dermody, 2012). El ciclo de replicación viral tiene lugar enteramente en el citoplasma. Durante el desensamblaje viral, la proteína de la cápsida externa $\sigma 3$ es degradada por proteasas, la proteína de unión $\sigma 1$ experimenta un cambio conformacional, y la proteína de la cápsida externa $\mu 1$ es cortada para formar partículas subvirales infectivas (*infected subviral particles*, ISVPs) (Danthi *et al.*, 2010). Los fragmentos de $\mu 1$ experimentan un reordenamiento conformacional para facilitar la entrada en el endosoma y la liberación de partículas de core transcripcionalmente activas al citoplasma (Nibert *et al.*, 2005). La primera transcripción tiene lugar dentro del core, sintetizando moléculas de ssRNA (+) con extremo 5' cap que son transcritos o encapsidados dentro de los cores virales, donde sirven como molde para la síntesis de la hebra de polaridad negativa. Dentro de los nuevos cores virales, tiene lugar una segunda ronda de transcripción. Las proteínas de la cápsida externa se incorporan a los cores nacientes, los cuales silencian la transcripción viral, generando nuevas partículas virales. La salida de reovirus de la célula podría tener lugar mediante lisis, pero no se conoce todavía el mecanismo de salida (Dermody, 2013). En la Figura 18 se muestra un esquema del ciclo de replicación de reovirus.

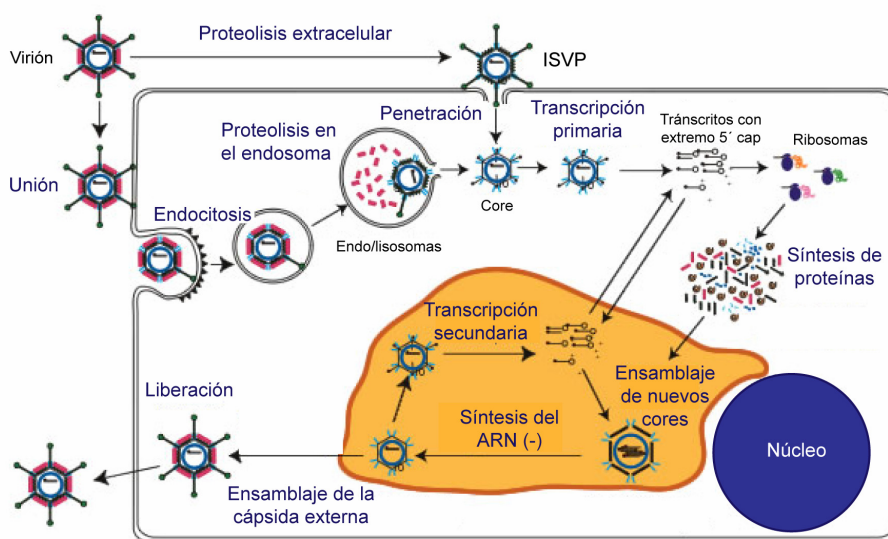


Figura 18. Ciclo de replicación de reovirus en el citosol de células infectadas

Tras la entrada en la célula por endocitosis mediada por receptores y $\beta 1$ integrina, comienza la transcripción de los 10 segmentos del genoma en el interior de los cores virales. Se generan ssRNA (+) con extremo cap que son transcritos para la síntesis de proteínas virales. En inclusiones citoplasmáticas tiene lugar el ensamblaje de nuevos cores, la síntesis del ssRNA (-) complementario y la transcripción secundaria. Se produce el ensamblaje de la cápsida externa para generar nuevos viriones que son liberados al exterior celular. Modificado de https://instruct1.cit.cornell.edu/research/parker_lab/Reovirus.htm.

5.4. Ensamblaje de inclusiones virales

Los estudios hasta la fecha señalan que los virus dsRNA generan estructuras citoplasmáticas carentes de membranas, denominadas inclusiones o factorías virales, con morfología característica, y que presentan proteínas virales y ARN. Estas estructuras constituirían el sitio donde se sintetiza el ARN de polaridad negativa y donde se da el ensamblaje viral (Coombs, 2006). Las inclusiones virales son detectables a las 4 horas post-infección mediante inmunofluorescencia, contienen proteínas virales y dsRNA, y partículas virales en distintos estados de morfogénesis (Ooms *et al.*, 2012). En etapas más tardías de la infección viral, las inclusiones presentan matrices de partículas virales con estructura paracristalina (Dales *et al.*, 1965). Estudios de inclusiones virales formadas en células infectadas han demostrado que multímeros altamente ordenados de la proteína μ NS establecen las inclusiones formando una matriz, a la cual, se reclutan la proteína μ 2, la proteína no estructural σ NS, y otras proteínas virales estructurales (Patton *et al.*, 2006; Parker *et al.*, 2002; Becker *et al.*, 2001).

Las proteínas μ NS, μ 2, y σ NS participan en la formación de las inclusiones y en la maduración de las partículas virales. Además constituyen un componente indispensable para la replicación viral (Kobayashi *et al.*, 2006). Aunque la replicación del genoma, la transcripción secundaria, y la formación de la partícula viral tienen lugar en las inclusiones virales (ver ciclo de replicación Figura 18, en naranja inclusión de reovirus) (Dermody, 2013; Antczak and Joklik, 1992; Dales *et al.*, 1965), todavía no se conocen con detalle las distintas etapas del ensamblaje de la partícula viral. Se han encontrado poblaciones de partículas virales con distintos niveles de ARN viral y proteínas, así como actividades transcripcionales específicas (por ejemplo síntesis de ARN de polaridad positiva o negativa) que podrían representar distintos intermediarios dentro de la ruta de ensamblaje (Zweerink *et al.*, 1976; Morgan and Zweerink, 1975). Sin embargo, dichos intermediarios no se han correlacionado con eventos morfogenéticos específicos en las inclusiones virales.

La proteína μ 2 es un componente esencial de las inclusiones de reovirus, requerida para la replicación viral (Kobayashi *et al.*, 2009; Parker *et al.*, 2002). Se une a la proteína que forma la inclusión μ NS (Broering *et al.*, 2002) y determina diferencias en la morfología, filamentosa o globular, basadas en la capacidad para unir microtúbulos y anclar las inclusiones virales al citoesqueleto (Parker *et al.*, 2002). Aunque la proteína μ 2 participa en distintos eventos dentro del ciclo de replicación, sus funciones no se han relacionado con pasos específicos del ciclo de replicación viral, por lo que el mecanismo de acción de la proteína aun no se ha identificado.

Se piensa que las inclusiones de reovirus también podrían contener un número de proteínas celulares utilizadas por el virus, aunque la mayoría de estos factores todavía no han sido identificados. Se conocen dos proteínas celulares que son reclutadas a las inclusiones de reovirus: la chaperona Hsp 70 (Kaufer *et al.*, 2012) y clatrina (Ivanovic *et al.*, 2011), aunque no se conoce la función que desempeñan dentro de la factoría. Estudios de microscopía electrónica han identificado elementos del citoesqueleto asociados con las inclusiones virales, como por ejemplo microtúbulos. Se observaron microtúbulos recubiertos por la proteína $\mu 2$, los cuales, presentaron un diámetro superior al de los microtúbulos celulares normales. La morfología de la inclusión viral está relacionada con la capacidad de $\mu 2$ de asociarse a los microtúbulos, así se forman inclusiones filamentosas cuando $\mu 2$ se asocia a los microtúbulos de forma efectiva e inclusiones globulares en cepas en las que $\mu 2$ no se asocia a microtúbulos. La identificación de factores celulares implicados en replicación de reovirus, en particular, aquellos requeridos para la formación de la inclusión y maduración viral, definiría las funciones de $\mu 2$ y de otras proteínas virales en el proceso de morfogénesis viral. En la Figura 19 se puede apreciar una inclusión formada por reovirus T3 en células L929 obtenida mediante microscopía electrónica (A), en el panel B se muestran distintos tipos de partículas: partículas virales con doble cápsida, con solo la cápsida interna y cores vacíos. Detalle de los tres tipos de partículas se muestran en el panel C. Además, en la Figura 19D se muestra una imagen de microscopía confocal de las inclusiones formadas por reovirus en las que se localizan las proteínas σNS y μNS .

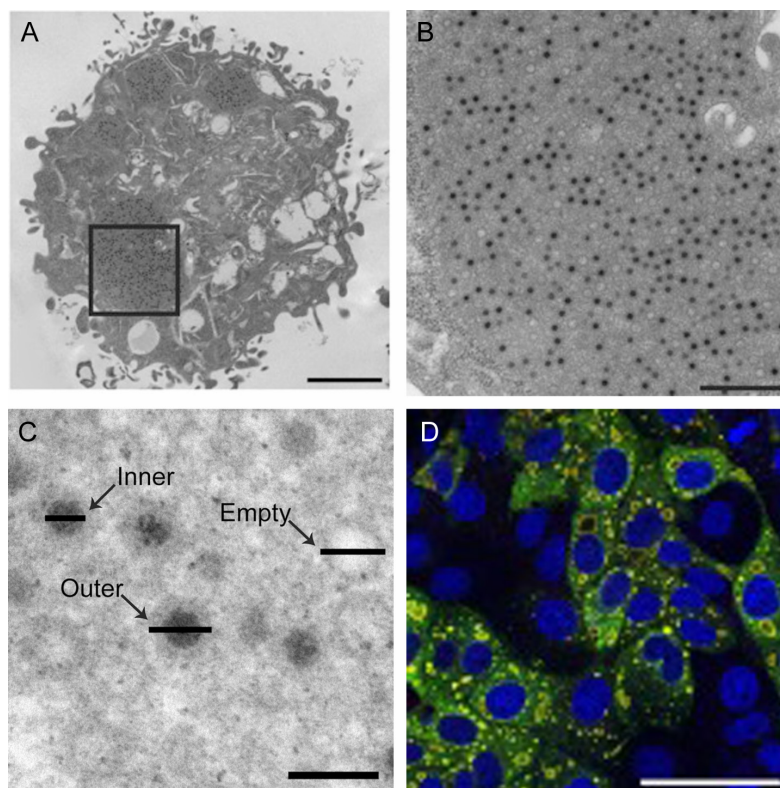


Figura 19. Inclusiones formadas por reovirus

A) Ultraestructura de una célula L929 infectada por virus T3 con 100 unidades formadoras de placa por célula (UFP/célula) y fijada a las 24 horas post infección (hpi). B) Mayor magnificación de la inclusión viral mostrada en A. C) Detalle de MET de las partículas virales presentes en la inclusión. Se observan partículas con doble cápsida (*outer*), con solo cápsida interna (*inner*) y cores desnudos (*empty*). D) Microscopía confocal de células infectadas por reovirus. Las inclusiones virales están definidas por la proteína σ NS (verde) y la proteína μ NS (rojo). Barras: 2 μ m en A; 500 nm en B; 100 nm en C; 50 μ m en D. Modificado de Ooms *et al.*, 2012.

6. Nuevos métodos de microscopía para el estudio de las infecciones virales. Metalotioneína como marcador clonable para MET

La estructura celular es el resultado de numerosas interacciones entre complejos macromoleculares. A pesar de los avances que se están realizando en el conocimiento de la arquitectura de las factorías virales y los CRs, todavía quedan muchas cuestiones por resolver. Los CRs son estructuras macromoleculares complejas, por ello, su visualización dentro de las células mediante MET, aporta información importante sobre su arquitectura y organización.

La caracterización detallada de la disposición de las proteínas en células vivas contribuiría al conocimiento de las interacciones macromoleculares subyacentes a las distintas funciones celulares (Robinson *et al.*, 2007). En microscopía de fluorescencia existen marcadores

clonables, como la proteína fluorescente verde o GFP, que han supuesto una auténtica revolución en biología celular para el estudio de proteínas en célula viva (O'Hare *et al.*, 2007; Robinson *et al.*, 2007; Giepmans *et al.*, 2006). En MET la detección de proteínas se realiza principalmente con nanoclusters de oro densos a los electrones. El método estándar para la localización de proteínas mediante MET es el uso de anticuerpos, proteínas solubles o ligandos unidos a oro coloidal (Sosinsky *et al.*, 2007). Sin embargo, este método presenta ciertas limitaciones, por ejemplo, el inmunomarcaje con anticuerpos tras la inclusión en resina está restringido a la superficie de la sección. Por otro lado, en los protocolos de marcaje antes de la inclusión en resina, las células tienen que ser permeabilizadas para permitir el acceso de los anticuerpos, lo que casi siempre va acompañado de una mala preservación de la ultraestructura. Incluso si los anticuerpos se introducen mediante microinyección (Kireev *et al.*, 2008) sólo pueden detectar un pequeño porcentaje de proteínas específicas, dependiendo de la localización de la proteína dentro de la célula y de sus interacciones con otras moléculas. El principal problema de los anticuerpos es, por tanto, su baja sensibilidad. Así, la existencia de un marcador clonable para MET aportaría nueva información sobre las proteínas dentro de las células, de manera similar a las aplicaciones de la GFP en microscopía de fluorescencia.

En trabajos de C.P. Mercogliano y D. DeRosier se mostró como la metalotioneína (MT), una pequeña proteína de unión a metales, se podía utilizar como marcador clonable para microscopía electrónica (Mercogliano and DeRosier, 2007; Mercogliano and DeRosier, 2006). Estos investigadores demostraron que MT purificada tiene la capacidad de formar clusters de oro *in vitro*, los cuales, pueden observarse en un microscopio electrónico (Figura 20). Posteriormente, se confirmó mediante estudios *in vitro*, la visibilidad de los clusters de oro cuando la MT es fusionada a componentes de complejos macromoleculares visualizados mediante crío-microscopía electrónica (Bouchet-Marquis *et al.*, 2012). La metalotioneína pertenece a una familia de proteínas ricas en cisteínas y de bajo peso molecular, que presentan la capacidad de unir metales pesados, oro entre ellos, en diferentes estados iónicos y en distintas proporciones estequiométricas (Furey *et al.*, 1986; Nielson *et al.*, 1985). Dicha proteína está presente en ciertos procariotas y eucariotas, donde su expresión está inducida por metales tóxicos y agentes que producen estrés oxidativo. Su principal función es controlar el almacenamiento e intercambio de metales biológicamente esenciales, como el zinc o el cobre, en células eucariotas.

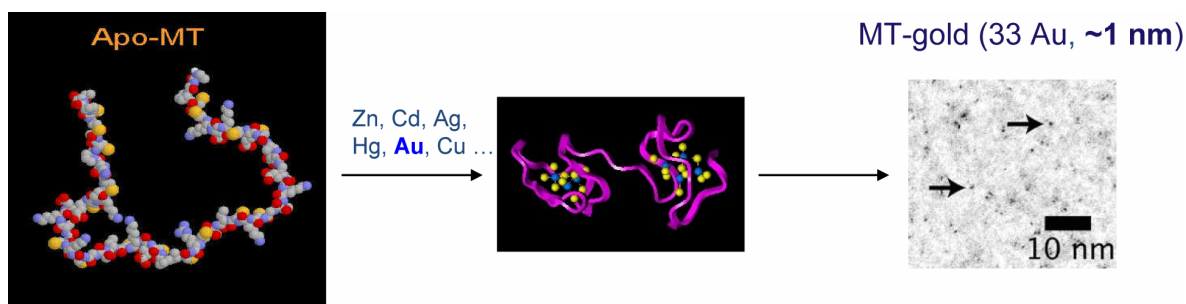


Figura 20. Capacidad de la metalotioneína para unir metales

Plegamiento de la metalotioneína cuando une metales, oro entre ellos, generando un nanocluster de 1 nm de diámetro, aproximadamente, que puede visualizarse mediante microscopía electrónica de transmisión. Modificado de Mercogliano and DeRosier, 2007.

La isoforma 1 de ratón (MT1), de bajo peso molecular (6 kDa), tiene 61 aminoácidos 20 de los cuales son cisteínas que pueden unir como máximo 40 átomos de oro con elevada afinidad (Mercogliano and DeRosier, 2006). Estudios bioquímicos y estructurales han demostrado que la MT se pliega formando dos dominios cuando une átomos de oro. Cada dominio está compuesto por un núcleo central formado por los átomos de oro, rodeado de la cadena polipeptídica con los grupos sulfhidrilo estableciendo puentes de unión con los clusters de oro (Furey *et al.*, 1986).

Cuando la MT es fusionada a una proteína de interés e incubada con oro, los residuos cisteína unen átomos de oro con alta eficacia, construyendo un nanocluster de 1 nm de diámetro, aproximadamente. La MT ha sido validada como marcador clonable para microscopía electrónica, utilizada para estudiar con alta resolución y sensibilidad proteínas dentro de las células, mediante un nuevo método: *metal-tagging transmission electron microscopy* o METTEM (Risco *et al.*, 2012). En la Figura 21 se muestra un esquema del fundamento del método METTEM, así como la comparación de dicho método con el uso de anticuerpos para el marcaje de proteínas (inmunomarcaje). Se puede apreciar la colocación de los anticuerpos con los nanoclusters de oro de la MT, observándose la diferencia considerable en el número de moléculas detectadas. Estos datos demuestran que aunque los anticuerpos son altamente específicos, el método METTEM permite localizar proteínas en células con mayor resolución y sensibilidad.

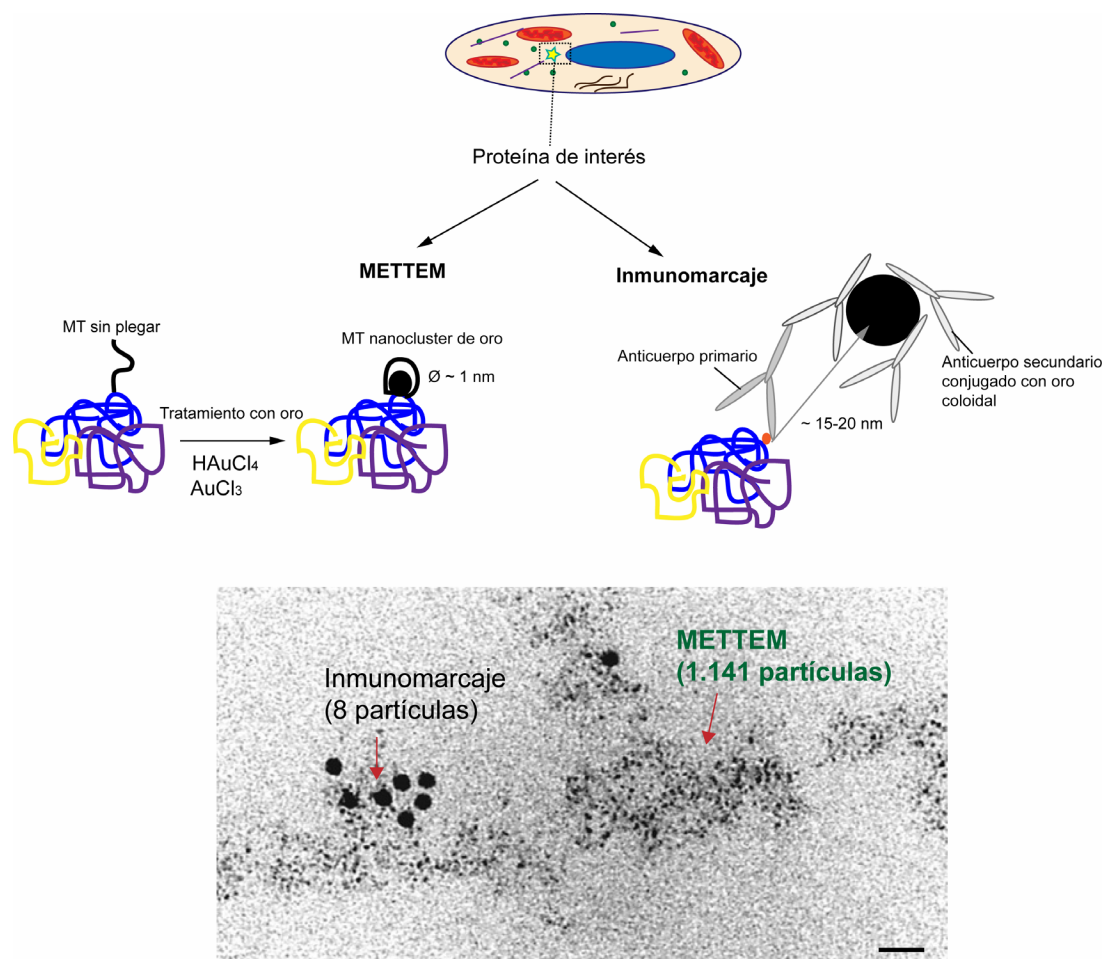


Figura 21. Fundamento del método METTEM y comparación con el inmunomarcaje con conjugados de oro coloidal

Cuando la MT se fusiona a una proteína de interés y se incuba con sales de oro, la MT une átomos de oro plegándose y formando un cluster de aproximadamente 1 nm de diámetro. La sensibilidad del método METTEM es muy superior a la del marcaje con anticuerpos. En la imagen de MET en la que se muestran estructuras filamentosas ensambladas por una proteína viral fusionada a MT, se detectaron 8 partículas mediante inmunomarcaje frente a las 1.141 detectadas con METTEM. Barra: 25 nm. Modificado de Fernández de Castro *et al.*, 2014; Risco *et al.*, 2012.

El uso de la MT como marcador para MET de proteínas en células, ha permitido la detección de proteínas intracelulares en bacterias (Diestra *et al.*, 2009a; Diestra *et al.*, 2009b) y en células de mamífero (Risco *et al.*, 2012). Distintas proteínas de bacterias se fusionaron con MT y fueron analizadas mediante METTEM. Una de las proteínas estudiadas fue AmiC, componente del anillo de división en *Escherichia coli*, la cual, se fusionó con una copia de MT y se expresó en células. La distribución de AmiC fue idéntica a la encontrada en células que expresaban AmiC-GFP (Figura 22A). En células en división, la proteína se concentró en el anillo de división y en el periplasma (Figura 22B) (Diestra *et al.*, 2009b), mientras que AmiC se detectó tanto en el periplasma como en los polos de células que no estaban dividiéndose (Figura 22C). Mediante tomografía electrónica se pudo visualizar la organización tridimensional de los

complejos AmiC-MT; observándose diferentes estados de agregación de las moléculas de AmiC en el periplasma, los polos y el anillo de división (Figura 22D y E).

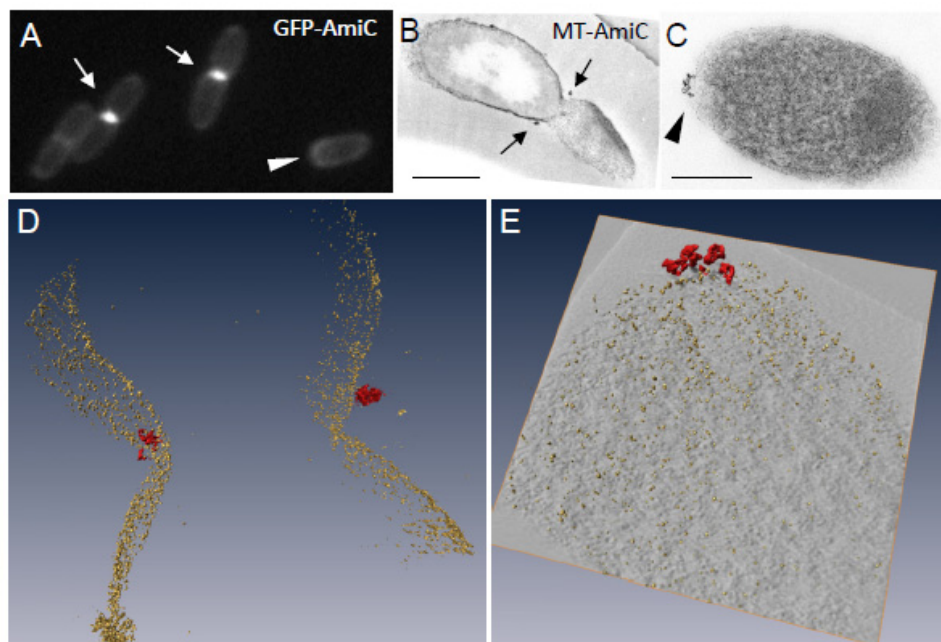


Figura 22. Localización de AmiC en *E.coli*

A) Microscopía de fluorescencia de células de *E.coli* que expresan AmiC-GFP. La proteína se acumuló en el periplasma y polos de células que no estaban en división (punta de flecha), mientras que en células en división se localizó en el periplasma y en el anillo de división (flechas). B y C) MET de secciones ultrafinas de bacterias en división (B) y sin dividir (C) que expresan AmiC-MT y tratadas con sales de oro. Los clusters de MT-oro se observaron en el periplasma, los polos y en el anillo de división. D y E) Modelos 3D de la distribución de moléculas AmiC-MT en bacterias, obtenidos mediante tomografía electrónica. Barras: 200 nm. Modificado de Fernández de Castro *et al.*, 2014; Diestra *et al.*, 2009b.

Posteriormente, se utilizó el marcador MT para estudiar la localización intracelular de proteínas del VRUB en células de mamífero (Risco *et al.*, 2012). Se transfectaron células con replicones que expresaban la replicasa viral P150 fusionada con el marcador MT. En la Figura 23A se observa el reclutamiento de P150-MT a una vacuola citopática o CPV, orgánulo de replicación del VRUB. Imágenes a mayor magnificación de la CPV y de los clusters de P150-MT se muestran en las Figuras 23B y C, respectivamente. Con el método METTEM se pudo observar que la replicasa viral se acumulaba primero en membrana plasmática, formando complejos que eran internalizados en endosomas y lisosomas constituyendo finalmente las CPVs; donde las moléculas de replicasa estaban densamente empaquetadas (Risco *et al.*, 2012). Por otro lado, también se analizó con METTEM la localización subcelular de la proteína de la cápsida, observándose un reclutamiento de la proteína a las CPVs (Figura 23D).

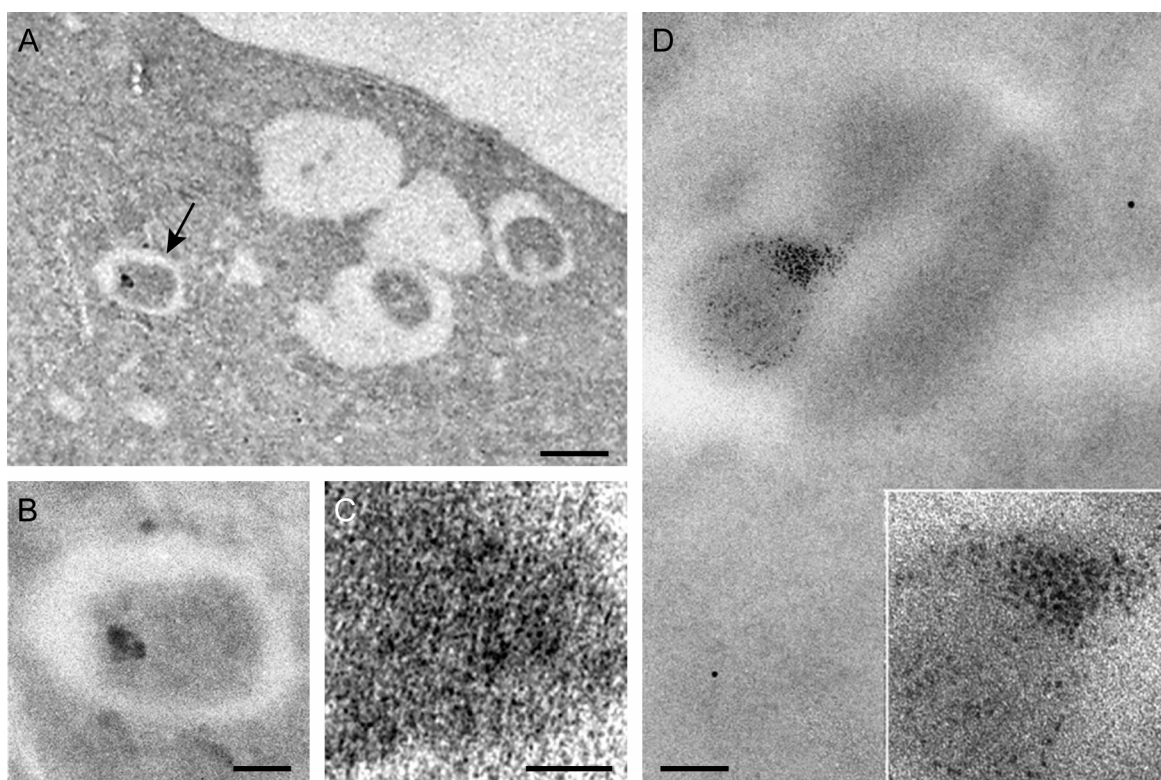


Figura 23. Visualización de proteínas del virus Rubella mediante METTEM

A-C) Células de mamífero se transfectaron con replicones que expresan la replicasa viral P150 fusionada con el marcador MT, tratadas con oro y analizadas con MET. La replicasa viral se concentra en vacuolas citopáticas o CPVs. Mayor magnificación de la misma CPV (B) y de los clusters de P150-MT (C). D) Células de mamífero que expresan la proteína de la cápsida viral con el marcador MT, se analizaron con el método METTEM. La proteína de la cápsida también es reclutada a las CPVs. Barras: 0.5 μm en A; 200 nm en B y D; 25 nm en C. Obtenido y modificado de Risco *et al.*, 2012.

Las nuevas técnicas de imagen y localización de proteínas pueden ayudarnos a entender la arquitectura y biogénesis de las factorías virales y orgánulos de replicación, objetivo central de esta tesis doctoral.

Objetivos

- 1) Caracterización estructural de la factoría viral y del complejo replicativo de tombusvirus.
- 2) Análisis de la función de las proteínas celulares ESCRT, Pah1 y actina en la replicación de tombusvirus y el ensamblaje del complejo replicativo viral.
- 3) Caracterización estructural de la factoría del virus Bunyamwera en células Vero. Estudio del papel de las proteínas mitocondriales p32 y Mfn-2, y de la miosina-9 en la factoría del virus Bunyamwera.
- 4) Estudio de la implicación de los orgánulos celulares en la formación y de las factorías de reovirus.

Materiales y Métodos

1. Materiales

1.1. Células y virus

-Levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*): la cepa BY4741 (*MATa his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0*), las cepas donde distintos genes ESCRT habían sido delecionados (Δ vps4, Δ vps23, Δ vps24 y Δ snf7), y la cepa donde los genes pah1 y nem1 habían sido delecionados (Δ pah1) se obtuvieron de *Open Biosystems*. También se usó una cepa que expresaba la proteína ESCRT Vps4 fusionada a los marcadores HA y MT (Vps4-MT-6HA), todas las cepas de levadura fueron cedidas por el Dr. Peter D. Nagy (*University of Kentucky*, Lexington, EEUU). Se crecieron en medios mínimos sin uracilo y leucina (-UL), dichos aminoácidos se utilizaban como factores de selección. Para 1 litro de medio se añadían: 6.7 g de *yeast nitrogen base without amino acids*, 1.4 g *yeast synthetic drop-out medium w/o His, Leu, Trp & Ura*, 0.1 g de Trp y 0.1 g de His (Sigma-Aldrich®). Como fuente de carbono se utilizó glucosa o galactosa al 2% (Sigma-Aldrich®). Aunque las levaduras crecían mejor con glucosa la galactosa era necesaria para la expresión de los plásmidos con promotor pGAL. Si no se transformaban y no se requería la expresión de plásmidos, se crecían en medio YPD (*yeast extract, peptone, dextrose*).

-Células Vero: células epiteliales de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (*American type culture collection*, ATCC; referencia CCL-81). Se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's modified eagle's medium*, DMEM; Gibco®/Invitrogen™), suplementado con 4,5 g/l de glucosa, aminoácidos no esenciales (Sigma- Aldrich®), glutamina (Sigma-Aldrich®) 200 mM, gentamicina (Sigma-Aldrich®) 50 µg/ml, penicilina/estreptomicina 100 U/ml / 100 µg/ml y suero fetal bovino (*fetal bovine serum*, FBS; Reactiva S.A.) al 10%.

-Células BSR-T7/5: células derivadas de BHK-21 (fibroblastos de riñón de hámster, *baby hamster kidney cells*; referencia CCL-10) que expresan de forma constitutiva la ARN polimerasa del bacteriófago T7 (Buchholz *et al.*, 1999), por lo que pueden expresar plásmidos que tengan el promotor de dicha polimerasa. Fueron donadas por el Dr. KK. Conzelmann (*Maxvon Pettenkofer Institut*, Munich, Alemania). Se cultivaron con el mismo medio que las células Vero, DMEM completo sin gentamicina y añadiendo geneticina G418 (Gibco®/Invitrogen™) a 1 mg/ml como agente de selección.

- Virus Bunyamwera (VBUN): Se obtuvo en la ATCC, con referencia BR-87.

1.2. Anticuerpos y sondas

Anticuerpo monoclonal anti-ARN de doble cadena J2 (anti-dsRNA) fue comprado a *English and Scientific Consulting* (Hungria). Este anticuerpo fue validado como marcador de replicación viral para diferentes virus ARN de polaridad positiva (Westaway *et al.*, 1999).

Anticuerpo monoclonal contra polihistidina (anti-His) se compró a Sigma-Aldrich®, referencia H1029. Reconoce la cola de histidinas que se une como marcador a las proteínas.

Anticuerpo policlonal contra hemaglutinina (anti-HA) de Abcam®, referencia ab9110. Se utilizó para reconocer el marcador HA fusionado a las proteínas de interés.

Para detección de proteínas del VBUN se utilizaron distintos anticuerpos. El anticuerpo policlonal generado en conejo contra la forma extracelular del VBUN (anti-VBUN) y el anticuerpo monoclonal Mab742 contra la glicoproteína Gc del VBUN (anti-Gc) descritos en (Weber *et al.*, 2001; Lappin *et al.*, 1994; Watret *et al.*, 1985) y cedidos por el Dr. R.M. Elliott (*University of St. Andrews*, Escocia). El anticuerpo policlonal contra la nucleoproteína N (anti-N), descrito en (Fontana *et al.*, 2008), fue generado mediante inmunización en conejo con el péptido sintético MIELEFHDVAANTSST correspondiente a la región amino terminal de la proteína.

Para marcar el aparato de Golgi, se utilizó un anticuerpo que reconoce gigantina (proteína estructural del aparato de Golgi), y que fue cedido por el Dr. M. Renz (*Institute of Immunology and Genetics*, Karlsruhe, Alemania).

Los anticuerpos policlonales específicos para detectar la proteína disulfuro isomerasa (PDI, enzima del RER) y actina (componente del citoesqueleto), se compraron en Sigma-Aldrich®, referencias: M-12 y A-2668, respectivamente.

Para detectar proteínas mitocondriales se utilizó el anticuerpo policlonal contra p32 (proteína de la matriz mitocondrial), cedido por el Dr. W. C. Russell (*University of St. Andrews*, Escocia). El anticuerpo policlonal que reconoce mitofusina 2 (Mfn-2, proteína de la membrana mitocondrial externa) se compró en Abcam®, referencia ab50838.

El anticuerpo monoclonal contra bromo uridina (anti-BrU) se compró en Abcam®, referencia ab6326.

Los anticuerpos secundarios y la faloidina conjugados con sondas fluorescentes Alexa Fluor® se compraron a Molecular Probes®/ Invitrogen™. La sonda para el marcaje de núcleos diclorato de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) se obtuvo de Sigma-Aldrich®.

Para los inmunomarcajes de microscopía electrónica se usaron anticuerpos secundarios monoclonales y policlonales conjugados con oro coloidal de 5 y 10 nm de diámetro de British Biocell International Ltd., Cardiff, Reino Unido.

Los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (anti-POD) se compraron en Amersham-GE Healthcare, Friburgo, Alemania.

1.3. Otros reactivos

La citocalasina-D (inhibidor de la polimerización de los filamentos de actina), la actinomicina-D (inhibidor de la ARN polimerasa celular), la blebistatina (inhibidor de la miosina-9 o *non-muscle myosin heavy chain IIA* (NMHC-IIA)) y el ditioneitol (DTT, agente reductor) se compraron en Sigma-Aldrich®.

El reactivo Lipofectamina® 2000, utilizado para la transfección de células de mamífero mediante la formación de liposomas, y el medio de transfección Opti-MEM son de Gibco®/Invitrogen™.

Las enzimas de restricción empleadas, Platinum® *Taq DNA Polymerase High Fidelity* y la ligasa T4 se compraron en Invitrogen™.

Para la amplificación de plásmidos se usó el kit *QUIAprep Spin Miniprep Kit* de Qiagen®. El marcador de pesos moleculares para ADN, *1 kb DNA ladder* de Promega Corp., EEUU.

El marcador de pesos moleculares utilizado fue el *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards*, de Bio-Rad Laboratories Inc., EEUU. El kit para el revelado de la reacción de POD, *Enhanced Chemiluminescence (ECL) Plus Western Blotting Detection*, es de Amersham-GE Healthcare.

El medio de montaje para inmunofluorescencias (ProLong®), la saponina (utilizada para permeabilizar las células), el Optiprep® (para generar gradientes de densidad) y el ácido cloroáurico (HAuCl₄) se obtuvieron en Sigma-Aldrich®.

Para la generación de esferoplastos se utilizó la enzima zymolyase® 20T (digiere la pared celular de levaduras) de Amsbio®, fue cedida por el Dr. José Antonio Tercero, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO), Madrid, España.

2. Bioquímica

2.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS)

Para la desnaturalización de las proteínas se añadió tampón de carga a las muestras, en este caso células de mamífero o virus purificados, y se realizaron tres ciclos de sonicación y choque térmico a 95°C. Las levaduras se resuspendieron en NaOH 0.1 M y se incubaron 15 min a temperatura ambiente (*room temperature*, RT) con agitación. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante por centrifugación, se resuspendieron en tampón de carga y se agitaron 15 min a RT. A continuación, se pusieron en hielo y se incubaron a 85°C durante 15 min.

Se usaron geles de poliacrilamida con dos fases, una para la concentración de las proteínas con un bajo porcentaje de acrilamida (5%), y otra con un porcentaje de acrilamida mayor (8-17%) y dependiente del peso molecular de las proteínas, para su separación. Se cargaron las muestras y el marcador de peso moleculares y se sometieron a un campo eléctrico de 100 mV en el sistema de electroforesis *Mini-Protean*® acoplado a una fuente eléctrica *Bio-Rad Power-PAC*™ 300, de Bio-Rad Laboratories Inc. Las proteínas cargadas migran en el gel por la aplicación del campo eléctrico y se separan en función del peso molecular.

2.2. Inmunotransferencia e inmunodetección (*western blot*)

Partiendo del gel de poliacrilamida con las proteínas separadas mediante PAGE-SDS, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa *Trans-Blot*® *Transfer Medium* con tampón de transferencia y con un sistema de transferencia semi-húmedo *Trans-Blot*® *Semi Dry Transfer Cell*, de Bio-Rad Laboratories Inc. La transferencia se realizó a 15 v durante 50 min, aunque el voltaje y el tiempo se suelen ajustar según el peso molecular de las proteínas a transferir.

Para la detección de las proteínas con anticuerpos es necesario bloquear la membrana en tampón de bloqueo (Leche en polvo al 3%, Tween-20 al 0,05 % en PBS) durante toda la noche a 4°C y en agitación. Así se evitan las uniones inespecíficas. Posteriormente, la membrana se incubó durante 1 h a RT con el anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo. Se realizaron tres lavados de 5 min, con Tween-20 al 0.1% y en agitación. Se incubó con el anticuerpo secundario anti-POD durante 1 h a RT y en agitación. A continuación, se realizaron tres lavados

con Tween-20 al 0.3% y 0.1%, y se incubó con los reactivos del kit ECL. La reacción de quicio-luminiscencia se reveló en una película fotográfica *RP2 plus* de Agfa Healthcare NV., Bélgica.

3. Biología molecular

3.1. Generación de plásmidos que expresan los elementos necesarios para la replicación de tomosvirus

Para el ensamblaje de un CR funcional en tomosvirus y para que tenga lugar replicación viral, son necesarias las replicasas virales p33 y p92; así como un ARN *template* (DI72). Se pretende obtener un plásmido que exprese la replicasa viral p33 fusionada a los marcadores His y MT. Para ello, se partió del vector pESC (L) Flag33/Flag92 que expresaba las replicasas virales con el marcador Flag. Se substituyó el segmento de ADN que expresaba p33-Flag por un inserto que expresaba p33-His-MT (Figura 24).

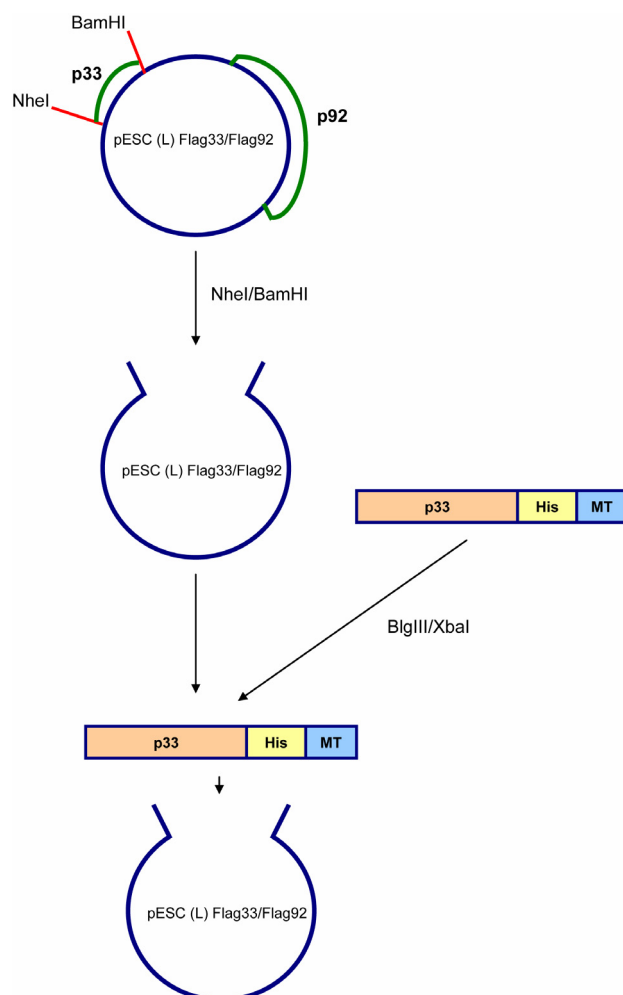


Figura 24.
Esquema de la estrategia de generación de plásmidos que expresan p33-His-MT

Digestión del vector pESC (L) Flag33/Flag92 con las enzimas de restricción NheI y BamHI. En rojo se marcan los puntos de restricción. Ligación del vector con el inserto que expresa la replicasa viral p33 fusionada a los marcadores His y MT.

-Preparación del inserto

Se amplificó el inserto mediante reacción en cadena de la polimerasa o PCR:

- Agua estéril
- 10X *high fidelity buffer*
- 10 mM dNTPs
- 50 mM MgSO₄
- Oligos *forward & reverse*
- ADN *template*
- Platinum® *Taq DNA Polymerase High Fidelity*

Los programas de amplificación mediante PCR constan de tres etapas. La primera etapa se lleva a cabo a una temperatura elevada, para la desnaturalización del ADN. El tiempo y la temperatura de desnaturalización dependen de la longitud de la hebra de ADN y de la cantidad de guanina (G) y citosina (C). La segunda etapa es la de alineamiento en la que el cebador se une a la secuencia complementaria del ADN molde. La tercera y última etapa es la de extensión o elongación, donde la polimerasa añade los dNTPs en dirección 5' → 3'. El tiempo de elongación depende de la polimerasa y del tamaño del segmento a amplificar.

Las condiciones en este caso fueron:

- 1 ciclo de 94°C 5 min
- 25 ciclos de: 94° C 30 seg, 55° C 30 seg, 68° C 1 min 30 seg
- 1 ciclo 68 ° C 3 min

El producto de la PCR se trató con fenol/cloroformo y etanol, para eliminación de la polimerasa y de los tampones.

Posteriormente, se realiza la digestión del inserto con las enzimas de restricción BglIII y XbaI y sus tampones correspondientes a RT durante toda la noche (*over night*, o/n).

Los productos de PCR se aislaron en un gel de agarosa al 1% en TAE (Tris base 40 mM, ácido acético glacial 20 mM y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2 mM) con bromuro de etidio (BrEt) a un voltaje de 120 V durante 30 min. El BrEt es un agente intercalante de ácidos nucleicos, es usado como marcador de ADN o ARN ya que una vez unido emite una señal fluorescente. Así, los productos de PCR se pueden ver en un transiluminador de luz UV a una longitud de onda de 365 nm. A partir del gel se cortó la banda de ADN correspondiente al inserto y se congeló a -80° C durante 10 min. Para la extracción y lavado del ADN del inserto se utilizó fenol/cloroformo y etanol.

-Preparación del vector

Se realizó la digestión del vector con las enzimas de restricción NheI y BamHI, con sus tampones correspondientes a RT o/n. Posteriormente, se incubó 30 min a 37° C con ribonucleasa A (RNasa A) para eliminar ARN, esto no es necesario si se trata de productos de PCR.

El vector se aísla a partir de un gel de agarosa, de la misma manera que con el inserto.

-Ligación

Se incubaron inserto y vector en relación molar 1:5 con la ADN ligasa del bacteriófago T4 a RT durante 4 horas u o/n a 4° C. Finalmente, se obtiene el plásmido pESC (L) HisMT33/Flag92, que expresa la replicasa viral p33 unida a los marcadores His y MT.

Con el producto de la ligación se transformaron bacterias competentes DH5α mediante choque térmico (pasando de 4°C a 42°C). Se sembraron en placas LB con ampicilina como antibiótico de selección y se incubaron o/n a 37°C.

Al día siguiente, a partir de las colonias transformadas se realizaron minipreps con el kit *QUIAprep Spin Miniprep* de Qiagen®, para extraer el ADN plasmídico. La comprobación de las minipreps se realizó mediante digestión con las enzimas de restricción correspondientes (BglIII y XbaI). Los productos de las digestiones se cargaron en un gel de agarosa al 1% en TAE, para verificar que colonias son "positivas"; es decir, colonias de bacterias transformadas que presentan el plásmido correspondiente. Así, las bacterias con dos fragmentos en el gel de agarosa, del tamaño del inserto y del vector, se consideraron "positivas" y se realizaron minipreps para amplificar el plásmido.

3.2. Transformación de células de levadura

Se transformaron distintas cepas de levadura (BY4741, $\Delta vps4$, $\Delta vps23$, $\Delta vps24$, $\Delta snf7$, Vps4-6HA y $\Delta pah1$) con plásmidos que expresaban los elementos necesarios para la replicación de tombusvirus bajo un promotor pGAL. Los plásmidos utilizados son: pESC (Leu) His MT p33/Flag p92 y pYC (Ura) DI72. Así, se obtuvo la expresión de las replicasas virales (p33 y p92) y el ARN *template* DI72, necesarios para ensamblar el CR funcional.

Se sembraron levaduras, a partir de los stocks de glicerol, en placas agar YPD y se incubaron a 30°C durante 1 o 2 días. Se sembró un precultivo de 2 ml de YPD con una colonia aislada, incubándose o/n a 30°C. Al día siguiente, se diluyó el precultivo a una densidad óptica (DO) de 0.2-0.3 en 50 ml de medio YPD. Las células se crecieron durante 3-4 h a 30 °C y 250 r.p.m.

Posteriormente, se centrifugó, se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados uno con agua destilada y otro con 100 mM de acetato de litio. Se permeabilizó la pared de las levaduras incubando con 100 mM de acetato de litio a RT durante 10-15 min.

Pasado ese tiempo, las células se resuspendieron en el medio de transformación: acetato de litio 1M, ADNss 10 mg/ml (aumenta la eficacia de la transformación), PEG MW3350 50% y 1-5 μ l de ADN plasmídico.

La transformación se realizó mediante choque térmico, incubando las células a 30°C durante 30 min y a 42 °C durante 40 min. Se centrifugó y se descartó el sobrenadante, resuspendiendo las células en agua destilada. Se sembraron las células transformadas en placas agar -UL (placas sin uracilo ni leucina; aminoácidos que aportan los plásmidos y que actúan como factor de selección), y se incubaron a 30°C durante 2-3 días.

3.3. Extracción de ARN total de levaduras y de plantas

Se crecieron células de levadura en 2 ml de medio de cultivo, se centrifugó y las células se resuspendieron en tampón de extracción de ARN (Acetato de sodio 50 mM pH 5.2, EDTA 10 mM, SDS 1%) y fenol en proporción 1:1, incubándose 4 min a 65°C. Se incubaron las células en hielo durante 2 min y se centrifugaron. El sobrenadante de la centrifugación se mezcló con acetato de sodio 3 M y etanol, incubándose 1 h a -20°C. Posteriormente, se centrifugó durante 20 min a velocidad máxima, se descartó el sobrenadante y se añadió etanol al 70%. Tras el lavado con etanol, se dejó secar el sedimento en la estufa durante 15-20 min, para eliminar todo el

etanol. El sedimento se resuspendió en agua estéril y la concentración de ARN se midió con un nanodrop® (*Spectrophotometer NanoVue* de GE Healthcare).

Para analizar las muestras de ARN en un gel de agarosa, se mezcló el ARN con tampón de carga 2X y se calentaron a 85 °C durante 5 min. Se cargaron en el gel de agarosa 1% en TBE (Tris base 0.1 M, ácido bórico 90 mM, EDTA 2.5 mM) con BrEt, y se sometieron a un voltaje de 120 V durante 40 min. La adquisición de las imágenes de los geles y el análisis de los resultados se realizaron con *BioRad Molecular Imager*® *Gel DocTM XR & Image LabTM software*.

Para la extracción de ARN total de plantas, se cortó tejido de hoja con una cuchilla de acero, obteniendo trozos de hoja de igual tamaño para las distintas muestras. Se homogenizó el tejido con un mortero, se añadió rápidamente tampón de extracción de ARN y fenol (1:1) y se introdujo en hielo. Es importante mantener las muestras en hielo hasta que se homogenizan todas las muestras, para evitar la degradación del ARN por ribonucleasas o RNAsas. A continuación, se procede con las mismas etapas descritas en el protocolo de extracción de ARN de levaduras.

4. Biología celular y Virología

4.1. Obtención de esferoplastos

Las distintas cepas de levadura se conservaron en stocks de glicerol al 15% congelados a -80°C. Si no se requería replicación viral, se usaba el medio rico YPD para el crecimiento de las levaduras. Las cepas transformadas con plásmidos para la expresión de los elementos necesarios para la replicación de tombusvirus, se crecían en medios mínimos –UL. Además, se requerían ciertas condiciones para la expresión de las proteínas virales y para la replicación viral. Los plásmidos presentan un promotor pGAL que está activado por galactosa pero inhibido por glucosa. Por otro lado, aunque la temperatura óptima de crecimiento de la levadura es 30°C, la máxima expresión de proteínas virales se obtenía con una temperatura de 23°C. Estas condiciones dificultaron el crecimiento de las levaduras.

A partir de dichos stocks, se sembraban placas de agar –UL + glucosa y se incubaban a 30 °C para obtener colonias aisladas. Posteriormente, se sembraban por picadura en 2 ml de medio –UL + glucosa y se incubaban durante 16 h a 30°C y 250 r.p.m.. Al usarse medios mínimos, era necesario crecer primero las levaduras en un medio con glucosa y a su temperatura óptima de crecimiento. Así, se conseguía arrancar el cultivo y obtener más biomasa. Posteriormente, se realizaron lavados con –UL + galactosa para eliminar la glucosa. Se crecieron cultivos de 50 ml en medio –UL + galactosa durante 24 h a 23°C y 250 r.p.m. El crecimiento de los cultivos se controlaba midiendo la D.O. a 600 nm con un espectofotómetro (*Biowave*

CO8000 cell density meter de WPA®). A las 24 h de crecimiento, la D.O. era alrededor de 2 y las levaduras se encontraban en fase exponencial de crecimiento, donde la expresión de proteínas es máxima. Además, en fase exponencial la pared de las levaduras no es tan gruesa como en fase estacionaria, lo que facilita su procesamiento para microscopía electrónica. También, se testó el crecimiento a 48 h, pero a este tiempo, las levaduras se encontraban en fase estacionaria y la pared celular era muy gruesa.

Posteriormente, las células se incubaron 10 min a RT con TSD (Tris sulfato 0.1 M, pH 9.4) y DTT, son agentes con poder reductor, para facilitar la acción de la zymolyase®. El DTT rompe los puentes disulfuro y hace que los enlaces β -glucano sean más accesibles a la actividad β -glucanasa de la zymolyase®; facilitando la digestión de la pared celular. El tratamiento con zymolyase® se realizó en medio A (YNB (*yeast nitrogen base*) 1X, glucosa 2%, aminoácidos 1X, sorbitol 1 M y 20 mM de Tris-HCl pH 7.5), usando una concentración de enzima de 0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se incubó a 30°C durante 15 min. El medio A con sorbitol protege a los esferoplastos de la lisis por procesos osmóticos. Tras el tratamiento con zymolyase®, se realizó un lavado con medio B (YNB 1X, glucosa 2%, 1x de aminoácidos 1X, sorbitol 1M) para detener la acción de la zymolyase® y otro lavado con medio A.

4.2. Infección de plantas *Nicotiana benthamiana* con TBSV y tratamiento con citocalasina-D

La infección de *Nicotiana benthamiana* se realizó mediante *SAP-inoculation*. Se partió de un disco de hoja infectada por TBSV y congelada a -80°C. Se machacó con un mortero y se añadió acetato sódico 30 mM. El sobrenadante obtenido tras centrifugación se mezcló con celite al 5%. La mezcla del virus y celite se añadió a la superficie de la hoja y se extendió con el dedo. El celite es un abrasivo, genera heridas en la superficie de la hoja permitiendo la entrada del virus.

Cinco días después de la *SAP- inoculation*, se introdujo mediante infiltración citocalasina-D 0.08 mg/ml en fosfato potásico 0.2 M pH 6.8. A los dos días se valoró el posible efecto de la droga en replicación de TBSV.

Se testaron distintos sistemas de infección y tiempos, estableciéndose este protocolo como el óptimo para determinar el efecto de la citocalasina-D en plantas.

4.3. Cultivo de células de mamífero

Las células de mamífero se conservaron congeladas en nitrógeno líquido. La congelación se realizó en criotubos con medio DMEM y un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), agente crioprotector, a -80°C en un contenedor con isopropanol. Así, se consigue que la congelación de las células sea gradual y, por tanto, menor daño de las mismas. Posteriormente, las células se almacenaron en los tanques de nitrógeno líquido. Para la descongelación, se introdujeron los criotubos en un baño a 37°C, se eliminó el medio con DMSO y se resuspendieron en medio nuevo.

Para el cultivo de las células de mamífero se utilizó un incubador a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. Se realizaron pases de células cada 2-3 días en medio DMEM/FBS 10%, con cultivos periódicos controlando la confluencia de las células. Para levantar las células de la placa se utilizó una mezcla de tripsina y EDTA. Se incubaron con esta mezcla durante 5 min a 37°C; así, las células se levantan de la placa y se puede mezclar un porcentaje de dichas células con medio nuevo. La confluencia de las células se controló con un microscopio óptico invertido Zeiss Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss Int., Jena, Alemania).

4.4. Infección de células de mamífero con VBUN

Se infectaron monocapas confluentes de células Vero con VBUN para realizar los distintos experimentos. La cantidad de virus depende del título del stock viral, del número de células en la placa y de la multiplicidad a la que se quiera infectar (UFP/célula o unidades formadoras de placa por célula). Generalmente, se infectaba a 1 UFP/célula, pero en el caso de células transfectadas se utilizaron 5 UFP/célula, debido a que se infectaban con dificultad.

Se lavaron las células con DMEM y se añadió el inóculo viral con DMEM/FBS 2%, durante 1 h a 37°C y agitando cada 15 min. Esta incubación con el virus es la etapa de adsorción viral, se realiza para que el virus se una a los receptores de la superficie celular. Posteriormente, se retira el inóculo viral y se añade medio de cultivo fresco con un porcentaje de FBS al 2%, para ralentizar la división celular. Se incubó a 37°C las horas post infección (hpi) necesarias, según el experimento.

4.5. Propagación del stock original de VBUN en células de mamífero

Con este protocolo se puede propagar el VBUN original de ATCC para la generación de un stock viral con el que realizar las infecciones.

Se pusieron a crecer células Vero o BHK-21 en una placa p150 y con medio DMEM-FBS 10% a 37°C. Cuando se alcanzó la confluencia máxima, se infectó a 0.001 UFP/célula, multiplicidad suficientemente baja como para que las células no mueran inmediatamente y produzcan gran cantidad de virus. Se incubó con el inóculo viral durante 1 h a 37°C agitando cada 15 min. Pasada la hora de adsorción viral, se retiró el inóculo, se añadió DMEM/FBS 2% y se incubó durante 3-4 días a 32°C. La temperatura de incubación es inferior a la óptima de crecimiento, así se ralentiza el metabolismo celular y la dinámica de la infección, consiguiendo que las células produzcan mayor cantidad de virus.

A los 3-4 días post infección (dpi) se recogió el sobrenadante y se centrifugó 5 min a 1400 r.p.m. para eliminar los restos celulares. Se hicieron alícuotas y se congelaron a -80°C.

4.6. Titulación viral

Después de generar un stock viral es necesario titularlo, para conocer la cantidad de virus que hay en cada alícuota y poder realizar las infecciones. Además, esta técnica es útil para titular los sobrenadantes de ciertos experimentos y valorar el efecto de los tratamientos.

Se sembraron células Vero en una placa p24 en la dilución adecuada para que alcancen la confluencia en dos días.

En una placa p96 se realizaron diluciones seriadas del virus a titular con medio de dilución (DMEM 1X, glutamina 200 mM, FBS 2%, gentamicina 50 µg/ml, aminoácidos no esenciales (AANE) 10X y DEAE-dextrano 1%). Se infectaron las células confluentes con las diluciones seriadas del virus durante 1 h a 37°C agitando cada 15 min. Pasado el tiempo de adsorción viral, se retiró el inóculo y se añadió medio sólido Overlay (DMEM 2X, glutamina 200 mM, FBS 2%, gentamicina 50 µg/ml, AANE 10X y DEAE-dextrano 1% y agar 0.6%). Se incubó a 37°C durante 4 días.

A los 4 dpi, se fijaron las células con formaldehído al 1% durante 1 h a RT. Posteriormente, se retiró el fijador y el medio sólido y se tiñeron las células con cristal violeta durante 30 min a RT. Se lavó con agua y se dejó secar la placa.

Para calcular el título viral se contó el número de placas de lisis en la dilución adecuada.

4.7. Purificación de VBUN extracelulares

Se sembraron células BHK-21 en placas p150 para que alcanzaran una confluencia del 80% en 2-3 días. Se infectaron a 0.001 UFP/célula durante 1 h a 37°C, agitando cada 15 min.

Pasada la hora de adsorción viral, se retiró el inóculo, se añadió DMEM/FBS 2% y se incubó a 32°C durante 50-60 h. Posteriormente, se recogió el sobrenadante, donde estaban los virus extracelulares, y se centrifugó a 3700 g durante 20 min a 4°C en centrífuga Sorvall con un rotor GSA para eliminar los restos celulares. El sobrenadante de la centrifugación se pasó a través de un colchón de sacarosa al 30% (peso/volumen) en medio TEN (NaCl 0.1 M, Tris-HCl 0.01 M pH 7.4 y EDTA 1 mM) con inhibidores de proteasas y se centrifugó a 67.000 g durante 2,5 h a 4°C en una centrífuga Beckman con rotor SW28. Para obtener distintas fracciones con las partículas virales, el sedimento obtenido se centrifugó en un gradiente continuo de densidad, generado con distintas concentraciones de Optiprep® (de 13 a 22%) preparado en medio TEN con inhibidores de proteasas. El gradiente de densidad se preparó empezando por la capa más densa (22% en la parte inferior del tubo) se congeló y se añadió la siguiente capa. Así, sucesivamente, con todas las capas hasta llegar a la menos densa de 13% (parte superior del tubo). Un día antes de utilizarse se descongeló a RT obteniéndose un gradiente continuo. El sedimento se pasó por el gradiente mediante centrifugación en una centrífuga Beckman con rotor SW41Ti, durante 1,5 h a 250.000 g y 4°C.

Posteriormente, se recogieron las distintas fracciones del gradiente en alícuotas. La detección de las partículas virales en las distintas fracciones se realizó mediante tinción negativa y MET, almacenando, únicamente, las fracciones que contenían partículas virales a -20°C.

Para el estudio de las RNPs, los virus se sometieron a 10 ciclos de congelación-descongelación a -20°C. Así, se indujo la rotura de las partículas virales y la salida de las RNPs al medio, las cuales fueron estudiadas mediante tinción negativa.

4.8. Tratamiento con drogas

Se trataron células de levadura con citocalasina-D (inhibidor de la polimerización de los filamentos de actina), para obtener un incremento de la replicación de tombusvirus. El tratamiento efectivo y no tóxico consistió en incubar las células de levadura durante 24 h con 0.06 mg/ml de citocalasina-D, a 23°C y 250 r.p.m. para que la replicación viral sea máxima.

Para inhibir la miosina-9 o NMHC-IIA en células de mamífero se utilizó blebistatina, inhibidor específico de este tipo de miosina. Se pretendía conocer el efecto de dicha droga en la infección viral. Por ello, se infectaron células Vero con VBUN a 1 UFP/célula. Pasada la hora de adsorción viral, se retiró el inóculo y se añadió la blebistatina en DMEM a una concentración de 100 µM, incubándose a 37°C durante 30 min. No se añadió la droga con el virus para no interferir en las primeras etapas de la infección. Posteriormente, se retiró la droga, se añadió

DMEM/FBS al 2% y se incubó a 37°C. A las 6 hpi se fijaron las células para microscopía óptica y electrónica.

4.9. Transfección de células de mamífero

Se transfectaron células de mamífero (Vero y BSR-T7/5) confluentes al 80-90% crecidas en placas, en cubre-objetos o en Thermanox® (NUNC™, Nalge Nunc Int., Rochester, EEUU), utilizando lipofectamina® como reactivo de transfección.

Las células Vero se transfectaron con plásmidos que expresaban la proteína de interés fusionada a GFP o YFP. Se utilizaron plásmidos que expresaban proteínas mitocondriales: Mfn2-YFP, obtenido en Addgene® y p32-GFP cedido por el Dr. Yasuyuki Fujita (*University College London*, England, UK); y un plásmido que expresaba miosina-9 unida a GFP: pTRE-GFP-NMHC II-A, obtenido en Addgene®.

Las células BSR-T7/5 se transfectaron con plásmidos que expresan las proteínas del VBUN necesarias para la replicación viral. Los plásmidos fueron generados por la Dra. Noelia López Montero en el laboratorio del Dr. R.M. Elliott (*University of St. Andrews*, Escocia). Las construcciones utilizadas son: pT7ribo-L-MT y pTM-N. Con estos plásmidos se expresa la polimerasa viral L fusionada al marcador MT y la nucleoproteína N. El plásmido pT7ribo-L-MT expresa el gen de interés bajo el promotor T7 en el extremo 5', y en el extremo 3' presenta la secuencia de la ribozima de la hepatitis delta seguida del terminador T7. Si el plásmido se expresa en células que producen la ARN polimerasa del bacteriófago T7 (células BSR-T7/5), la polimerasa transcribe el ARN hasta el terminador T7, y la ribozima corta el ARN generando el extremo 3'. De esta forma se pueden obtener transcritos que presentan extremos 5' y 3' idénticos a los del ARN del VBUN en sentido positivo. El plásmido pTM-N presenta el promotor T7 y la secuencia IRES (*internal ribosome entry site*) del virus de la encéfalo-miocarditis (VEMC), para la expresión eficiente del gen diana. Es un plásmido utilizado para la expresión de proteínas en células que producen la polimerasa del bacteriófago T7. La cotransfección de células con ambos plásmidos implica la formación de RNPs.

Se mezcló 1 µg de ADN plasmídico con 10 µl de lipofectamina® en medio Opti-MEM durante 20 min a RT para la formación de los complejos liposoma-ADN. Posteriormente, se lavaron las monocapas de células, se añadió el ADN con la lipofectamina® y se incubaron a 37°C durante 5 h. Pasado este tiempo, se retiró el medio de transfección, se añadió DMEM/FBS 10% y se incubó a 37°C hasta las 48 horas post-transfección (hpt).

4.10. Ensayo de incorporación de análogos de nucleótido (BrU)

Esta técnica se utilizó para determinar si había replicación de VBUN en células transfectadas. Por lo tanto, a las 48 hpt se incubaron las células con 10 µg de actinomicina-D durante 1 h a 37°C en DMEM/FBS 2%. La actinomicina-D actúa en el núcleo de la célula, se une al ADN en el complejo de iniciación de la transcripción evitando la acción de la ARN polimerasa e inhibiendo la transcripción. Como se une al ADN también interfiere con la replicación celular. Es necesario inhibir la transcripción celular para que la BrU solo se incorpore y marque el ARN viral. La síntesis del ARN viral no se ve afectada por la actinomicina-D, ya que en el proceso se utilizan mensajeros maduros del citoplasma y no depende de la formación de nuevos mensajeros en el núcleo.

Pasada la hora de incubación, se retira el medio y se añade bromo uridina (BrU) a una concentración de 10 mM en DMEM/FBS 2%, incubándose 1 h a 37°C. La BrU se incorpora al ARN viral durante su síntesis y se utiliza como marcador de replicación viral. Posteriormente, se retiró la BrU y se incubó en DMEM/FBS 2% durante 2-3 h.

4.11. Tratamiento con oro y METTEM

-Células de mamífero

Las células transfectadas con los plásmidos pT7ribo-L-MT y pTM-N se trataron con oro, para que la MT fusionada a la polimerasa L uniese los átomos de oro y se generasen los clusters de MT visibles en el microscopio electrónico.

Se partía de células BSR-T7/5 crecidas en placas o en Thermanox® y transfectadas con lipofectamina®, para la expresión de las proteínas virales: L-MT y N.

A las 48 hpt, se incubaron con 0.5 mM de HAuCl₄ en DMEM sin FBS durante 15 min a 37°C. El FBS se suprime porque la incubación con suero podría producir fondo ya que es un compuesto muy rico en proteínas, algunas de ellas ricas en cisteínas y susceptibles de unir átomos de oro. Tras el tratamiento con oro, se realizó un lavado con DMEM y las células fueron procesadas para MET.

Las células de mamífero presentan MT endógena, detectada mediante *western blot* de lisados celulares e inmunomarcaje de crio-secciones (Risco *et al.*, 2012). Sin embargo, parece que las MT endógenas no inducen la formación de los clusters de oro, debido a que la expresión de dichas proteínas está muy controlada en eucariotas. Las MT celulares suelen estar unidas a metales como cobre o zinc, dejando muy poca MT libre en el citosol (Beyersmann and Haase,

2001). Los metales unidos a las MT celulares son sólo parcialmente desplazados por los átomos de oro (Schmitz *et al.*, 1980), de manera que las MT endógenas no son capaces de unir los átomos de oro necesarios para formar los clusters visibles al microscopio electrónico.

Para la visualización de los clusters de oro mediante METTEM es importante irradiar la muestra muy despacio para que disminuya el grosor de la resina, facilitando así la visualización de los clusters, y para que se estabilice la muestra. Los estudios se realizaron a magnificaciones de 40000/50000 aumentos, aunque en general los clusters suelen ser visibles a magnificaciones inferiores (~30000 aumentos). Además, se realizaron controles de células no transfectadas y tratadas con oro para descartar la presencia de fondo.

-Levaduras/esferoplastos

Los esferoplastos en medio A se trataron con HAuCl_4 2 mM durante 75 min. Se observó que el oro no precipita en medio A pero sí lo hacía en medio B, que no tiene Tris HCl. Tras el tratamiento con oro, se realizó un lavado con medio A y las células se procesaron para MET.

Las levaduras expresan MT endógena sólo en presencia de Cu (Butt and Ecker, 1987; Butt *et al.*, 1984), al igual que en células de mamífero, las MTs de levadura desempeñan una función de detoxificación frente a metales pesados. A pesar de que los niveles de MT endógena sean bajos en levaduras, se realizaron controles de células que no expresaban la proteína de interés fusionada a MT tratadas con oro, para descartar la presencia de fondo. También es importante irradiar despacio el área a estudiar y realizar el análisis y visualización de los clusters de MT a magnificaciones de 40000 o 50000 aumentos.

5. Microscopía óptica

5.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

La inmunofluorescencia es una técnica utilizada para estudiar la distribución de proteínas virales o celulares, que hace uso de anticuerpos primarios específicos y secundarios conjugados con fluorocromos.

Para los estudios de microscopía óptica, las células se crecieron en cubre-objetos y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% a RT durante 20 min. Tras la fijación, se realizaron 3 lavados con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 2mM, pH 7.4) de 5 min. Se almacenaron en PBS y a 4°C hasta su utilización.

Las células se permeabilizaron durante 10 min con PBS y saponina al 0.25%. Para evitar las uniones inespecíficas de los anticuerpos, se bloquearon durante 40 min con PBS, saponina al 0.25% y suero de cabra (SC) al 2%.

A continuación se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes en la dilución adecuada en PBS, saponina al 0.25% y SC al 2% durante 1 h a RT. Tras la hora de incubación, se lavaron 3 veces con PBS durante 5 min.

Posteriormente, se incubó con los anticuerpos secundarios correspondientes diluidos en PBS, saponina al 0.25% y SC al 2%, durante 45 min a RT y en oscuridad. Se lavaron 3 veces con PBS durante 5 min, también en oscuridad.

Para marcar los núcleos se realizó una incubación con DAPI diluido en PBS, saponina al 0.25% y SC al 2%, durante 20 min a RT y en oscuridad. La faloidina conjugada con una sonda fluorescente se incubó con el DAPI, para el marcaje de los filamentos de actina. Las células se lavaron 3 veces con PBS durante 5 min en oscuridad y se montaron los cubres con ProLong® en un porta-muestras.

Los análisis de las muestras por microscopía óptica se realizaron en el microscopio de fluorescencia Leica DMI6000B con cámara digital CCD Hamamatsu Orca R2, 12/16 bit 1344x1024 píxeles o en el microscopio confocal multiespectral Leica TCS SP5 (Leica Microsystems GmbH).

6. Microscopía electrónica de transmisión

6.1. Inclusión para el estudio de la ultraestructura

-Células de mamífero

Se partió de células crecidas en Thermanox® o en placa obteniendo un sedimento de células por centrifugación, se fijaron con PFA 4% y glutaraldehído (GA) 1% en HEPES durante 1 h a RT (fijación fuerte). Se realizaron 3 lavados con HEPES y se incubaron con tetróxido de osmio (OsO_4) al 1% y ferricianuro potásico ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) al 0.8% durante 1 h a 4°C en oscuridad. Las células se lavaron 3 veces con HEPES. A continuación, se incubaron con acetato de uranilo al 2% durante 40 min a 4°C en oscuridad. Estos compuestos actúan como agentes de tinción y contraste. Se realizaron 3 lavados con HEPES para eliminar el acetato de uranilo.

Posteriormente, se realizó la deshidratación de las células para sustituir el agua por compuestos que sean miscibles con la resina. En el caso de la resina epoxi se utiliza un gradiente

de acetona. Las células se incubaron en concentraciones crecientes de acetona (50%, 70%, 90% y 2x100%) durante 5 min a 4°C.

Para la infiltración en la resina, se incubaron en una mezcla de acetona y resina epoxi EML-812 (TAAB Laboratories Equipment Ltd.) en proporción 1:1 o/n a RT.

Al día siguiente, se hicieron dos cambios con resina pura 100% para eliminar los restos de acetona. En el caso de los sedimentos de células, se polimerizaron en cápsulas BEEM® (Ted Pella Inc., Redding, EEUU) a 60°C durante 48 h. Las células crecidas en el soporte de plástico o Thermanox® se polimerizaron en estuches BEEM® (Ted Pella Inc.) a 60°C durante 48 h.

-Levaduras/esferoplastos

Las células se fijaron 1 h a RT con fosfato de potasio 40 mM pH 6.6, sorbitol 1 M, PFA al 4%, GA al 1%, MgCl₂ 1 mM y CaCl₂ 1mM. Tras la fijación, se retiró el fijador y se realizaron lavados con fosfato de potasio 40 mM pH 6.6 y concentraciones decrecientes de sorbitol (0.75 M, 0.5 M y 0.25 M). Finalmente, se resuspendieron en fosfato de potasio 40 mM pH 6.6 sin sorbitol. De esta forma el sorbitol se fue eliminando paulatinamente.

Posteriormente, las células se incubaron 10 min a RT con metaperiodato de sodio al 1%, se lavaron con agua destilada y se incubaron 15 min a RT con 50 mM de cloruro de amonio. Por último, se realizó un lavado con agua destilada.

La digestión con zymolyase® generó una muestra heterogénea de levaduras con distintos grados de pared celular; es decir, en algunos casos la digestión de la pared fue completa obteniéndose levaduras sin pared, pero otras células conservaban parte de la pared celular o incluso la pared intacta. Dicha pared celular, dificulta la infiltración de las células en resina, por ello se introdujeron ciertas modificaciones en el protocolo de inclusión.

La etapa de incubación con agentes de tinción y contraste es la misma que para las células de mamífero. Sin embargo, se modificó el gradiente de acetona utilizado en la deshidratación (30%, 50%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% y 2x100%), realizándose incubaciones de 5 min a 4°C. Por lo tanto, la eliminación del contenido hídrico de las células se llevó a cabo de forma más gradual. Además, se realizó una última incubación de 5 min en acetona 100% a RT para favorecer la infiltración en la resina. Posteriormente, se siguieron las etapas del protocolo anterior, para células de mamífero.

-Plantas

Las hojas de *Nicotiana benthamiana* se cortaron en piezas muy pequeñas (rectángulos de 4x1 mm, aproximadamente) para facilitar la entrada del fijador. Se fijaron con GA 3.5% en tampón Sorenson 0.1 M pH 6.8 (mezclar 51 ml de NaH_2PO_4 con 49 ml de Na_2HPO_4). Se incubó con el fijador durante 2 h a RT y en condiciones de vacío para la correcta penetración del fijador. Se realizaron 3 lavados de 10 min con el tampón Sorenson 0.1 M y sacarosa al 5%. Las células se incubaron con OsO_4 al 1% durante 2 h a RT con vacío y se lavaron con agua 5 min.

La deshidratación se realizó con concentraciones crecientes de etanol (50%, 70%, 80%, 90%) durante 10 min a RT y con agitación. Además, se hicieron dos incubaciones con etanol absoluto (100%) durante 20 min a RT con agitación y dos incubaciones con óxido de propileno 15 min a RT.

La infiltración se realizó en resina epoxi-araldita y óxido de propileno (1:1) o/n en agitación. Al día siguiente se hizo un cambio resina y óxido de propileno en proporción 3:1 y se incubó 4 h a RT en agitación. Finalmente, se infiltró en resina 100% durante 8 horas en condiciones de vacío. Se polimerizaron a 60° C durante 48 h en estuches BEEM® (Ted Pella Inc.).

6.2. Inclusión de muestras para inmunomarcaje

Para la detección de proteínas con anticuerpos no se pueden introducir agentes de tinción y contraste durante la inclusión (OsO_4 , $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ y acetato de uranilo) ya que destruyen los epítomos reconocidos por los anticuerpos. Por el mismo motivo, el porcentaje de GA en el fijador no debe superar el 0.2%.

Las células de mamífero en Thermanox® o en forma de sedimento se fijaron con PFA 4% y GA 0.2% durante 1 h a RT (fijación débil). Se lavaron 3 veces con tampón PHEM (PIPES 20 mM, HEPES 50 mM, EGTA 20 mM, MgCl_2 4 mM, pH 6.9). La deshidratación se realizó con concentraciones crecientes de etanol (30%, 50%, 70% y 2x100%) durante 5 min cada incubación y a 4°C. La infiltración se realizó con resina acrílica LR-White y etanol en proporción 1:1 durante 1 h a RT y protegido de la luz. Posteriormente, se cambió la mezcla etanol: resina por resina 100% y se incubó o/n a RT. Al día siguiente, se hicieron dos cambios de resina 100% y se polimerizaron los sedimentos de células en cápsulas de gelatina (TAAB Laboratories Equipment Ltd.) a 60°C durante 48 h. En el caso de las células crecidas en Thermanox® se polimerizaron en eppendorf, llenos de resina, a 60°C durante 48 h.

El protocolo para incluir levaduras o esferoplastos en resina acrílica varía en las etapas de deshidratación y de infiltración. Las células se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol (30%, 50%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% y 2x100%) durante 5 min a 4°C. A continuación se incubaron con etanol 100% a RT durante 5 min. Se infiltraron en concentraciones crecientes de resina LR-White diluida en etanol (proporciones 1:2, 1:1 y 2:1) durante 1 h a RT y se mantuvieron protegidas de la luz. Se realizó un cambio con resina 100% durante 24 h a RT. Al día siguiente, se hicieron dos cambios de resina 100% y se polimerizaron en cápsulas de gelatina (TAAB Laboratories Equipment Ltd.) a 60°C durante 48 h.

6.3. Obtención de secciones ultrafinas

Los sedimentos de células polimerizados en cápsulas se tallaron con cuchillas de vidrio, para obtener un frente o área de corte en forma de trapecio y de pequeño tamaño. Además, se pulieron para dejar la superficie lo más lisa posible. En el caso de las células crecidas en monocapa sobre un soporte de plástico o Thermanox®, fue necesario eliminar el plástico y también se tallaron para obtener un frente en forma de trapecio, pero no se pulieron.

Las secciones ultrafinas, de aproximadamente 50 nm de grosor, se obtuvieron en un ultramicrotomo Leica EM UC6 (Leica Microsystems GmbH) con una cuchilla de diamante de 45° de inclinación (Diatome Ltd., Beil, Suiza). Para los estudios de tomografía electrónica, se utilizaron secciones más gruesas de aproximadamente 300 nm. Las células en monocapa se cortaron de forma orientada y paralela a la base, obteniéndose cortes de todo el volumen de la célula (Figura 25). Sin embargo, los sedimentos de células no se pueden cortar de forma orientada; realizándose cortes al azar. Los cortes se recogieron de la superficie del agua en la balsa de la cuchilla con un asa de hilo fino Perfect Loop (Diatome Ltd.) y se depositaron en rejillas de cobre (Gilder Grids, Lincolnshire, Reino Unido) sin plástico, en el caso de secciones de resina epoxi para estudios de ultraestructura, de oro sin plástico (Gilder Grids, Lincolnshire, Reino Unido) para realizar inmunomarcajes, y Quantifoil®/carbón R3.5/I Cu/Rh (Quantifoil Micro Tools GmbH, Jena, Alemania) para estudios de tomografía electrónica. Para la obtención de cortes seriados se utilizaron rejillas de ojal (Gilder Grids, Lincolnshire, Reino Unido) con plástico formvar al 0.5%-1%.

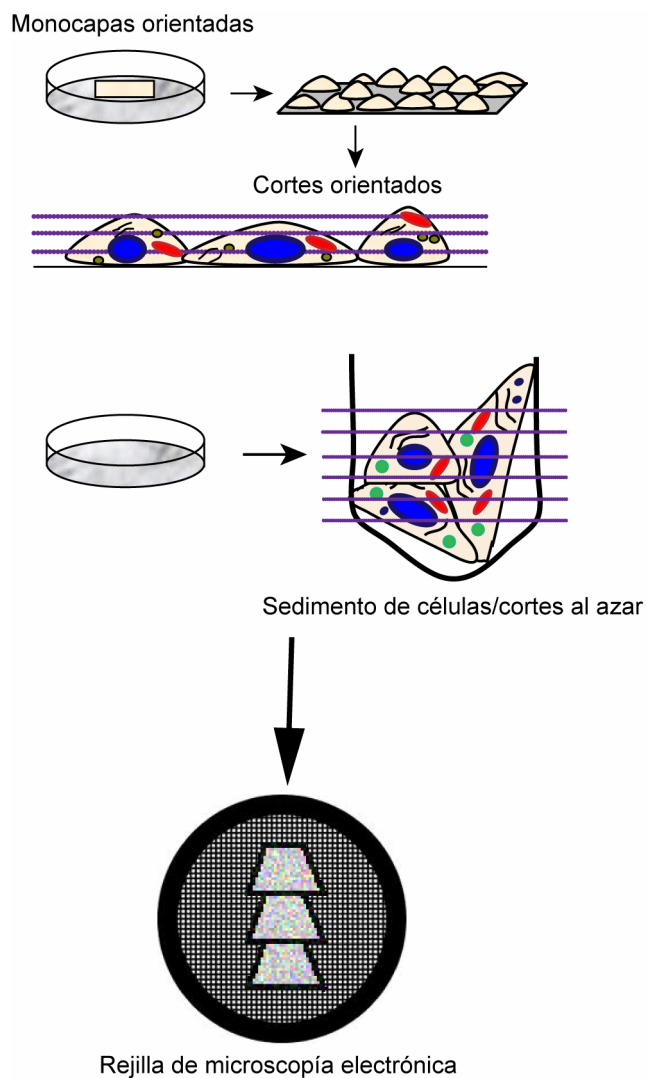


Figura 25.
Esquema del proceso de
corte en monocapas y
sedimento de células

Las células se crecieron en monocapa utilizando soportes de plástico o Thermanox®, y se cortaron de forma orientada. Las células se crecieron en placa, para generar un sedimento de células por centrifugación y se seccionaron de forma aleatoria.

6.4. Inmunomarcaje con anticuerpos

Las secciones de resina LR-White se incubaron 10 min con TBG (Tris-HCl 30 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, albúmina de suero bovino (*bovine serum albumin*, BSA) al 0.1% y gelatina al 1%) para bloquear las posibles uniones inespecíficas. Posteriormente, se incubaron con anticuerpos primarios diluidos en TBG durante 1 h a RT, se lavaron con 3 gotas de TBG y se incubaron 1 h a RT con anticuerpos secundarios conjugados con partículas de oro coloidal de distinto diámetro (5 o 10 nm) también diluidos en TBG. Se lavaron con 3 gotas de PBS y 5 gotas de agua Mili-Q y se dejaron secar.

En el caso de las muestras tratadas con oro, fue necesario ajustar el protocolo para poder visualizar los clusters de MT después del inmunomarcaje. Se substituyó el TBG por BSA al 1%,

porque la gelatina del TBG puede enmascarar los nanoclusters de MT. Además, se realizaron lavados de 5 min en 5 gotas de PBS y 5 gotas de agua Mili-Q.

Para la detección de proteínas en muestras de virus purificados mediante inmunomarcaje, es necesario utilizar rejillas de microscopía electrónica con una capa de plástico formvar y carbón. Se ionizaron las rejillas en la unidad de descarga iónica Leica EM MED 020 (Leica Microsystems GmbH) y se depositaron sobre una gota de la suspensión de virus durante 2 min. Así, los virus quedan adheridos a la rejilla, y se incubaron 5 min con TBG para evitar posibles uniones inespecíficas de los anticuerpos. Después se incubaron 10 min a RT con los anticuerpos primarios diluidos en TBG y se lavaron con 3 gotas de TBG. Posteriormente, las rejillas se incubaron 10 min con los anticuerpos secundarios conjugados con partículas de oro coloidal diluidos en TBG, se lavaron con 3 gotas de PBS y 5 de agua Mili-Q, se procesaron para tinción negativa y se dejaron secar.

6.5. Marcadores de referencia para tomografía electrónica

El procesamiento de los tomogramas requiere la existencia de marcadores de referencia o *fiducial markers*. Como marcador se utilizó *protein A-gold* de 10 nm (PAG 10). Las rejillas se incubaron en una solución de PAG 10 y PBS durante 15 min y se lavaron con 3 gotas de agua Mili-Q.

El estudio de las muestras de tomografía se realizó con el Crio-microscopio TEM Tecnai G2 F20 (FEI) 200 Kv FEG con cámara CCD Eagle 4k x 4k, y el Crio-microscopio TEM Tecnai Spirit Twin (FEI) 120 Kv LaB6 con cámara CCD Megaview 1k x 1k.

6.6. Tinción de muestras de microscopía electrónica

-Tinción de secciones

Para obtener mayor contraste en los cortes y poder realizar estudios ultraestructurales, las rejillas de microscopía electrónica con las secciones se incubaron en una gota de acetato de uranilo saturado durante 20 min en oscuridad y a RT. Después, se lavaron con 3 gotas de agua Mili-Q y se dejaron secar 30 min. Posteriormente, se incubaron con citrato de plomo durante 2 min a RT y se lavaron con 3 gotas de agua Mili-Q.

-Tinción negativa de virus

Se ionizaron rejillas con plástico formvar y carbón en la unidad de descarga iónica Leica EM MED 020, para la adhesión de los virus a la superficie de la rejilla. Las rejillas ionizadas se depositaron sobre una gota de la suspensión de virus durante 2 min. A continuación, se incubó con acetato de uranilo al 2% durante 30 seg a RT, se eliminó el exceso de líquido con el papel de filtro y se dejó secar.

La visualización mediante MET y estudio de las rejillas se realizó con un microscopio Jeol JEM 1011 a un voltaje de 100 kv. Las imágenes se obtuvieron por impresión de negativos Kodak Electron S0-163 (Eastman Kodak Company, Rochester, EEUU) o mediante una cámara digital acoplada al microscopio CCD 785-ES 1000W Erlangshen (Gatan Inc., Pleasanton, EEUU).

7. Procesamiento de imágenes y reconstrucción 3D

-Reconstrucción 3D de cortes seriados

Se partió de una serie de cortes (6-12 cortes o secciones), se buscó la región de interés en el microscopio electrónico y se verificó que estaba presente en todos los cortes. A continuación, se sacaron fotos de la zona de interés en todos los cortes y a la misma magnificación. Los negativos se escanearon con un escáner EPSON perfection V500 a una resolución de 600 píxeles por pulgada (ppp).

El alineamiento de las imágenes se llevó a cabo utilizando el programa Reconstruct (<http://synapses.clm.utexas.edu/tools/index.stm>). Posteriormente, con el programa Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) se generó un *stack*, archivo en formato TIFF que contenía todas las imágenes alineadas y el *stack* invertido, en el que se invierte la escala de grises. Dichos archivos se cargaron en el programa Amira (<http://amira.zib.de>), se aplicó 3 veces el filtro mediana, se segmentaron las estructuras de interés y se visualizaron en 3D. La resolución en el eje Z está limitada por el grosor de la sección, que en este caso, es de 50 nm (aproximadamente) y por la calidad del alineamiento.

-Reconstrucción 3D de tomogramas

Se cogieron imágenes de la estructura o área de interés de una sección gruesa (~300 nm), mediante proyecciones con distinto ángulo de inclinación, a lo largo de un solo eje, desde -60° a +60°. Se utilizó el programa IMOD (Kremer *et al.*, 1996) para el alineamiento de las imágenes,

mediante un modelo con los *fiducial markers* o marcadores de referencia, y para la generación del tomograma. Con el programa Amira, se aplicó un filtro de tipo Gaussiano, se realizó la segmentación y se visualizó el volumen 3D. Las membranas en los tomogramas se segmentaron mediante el empleo de programas de detección automática de este tipo de estructuras (Martinez-Sanchez, 2014; Martinez-Sanchez *et al.*, 2013; Martinez-Sanchez *et al.*, 2011).

Resultados

1. Tomato bushy stunt virus

1.1. Replicación viral y expresión de proteínas virales en levadura

Se realizó extracción de ARN y proteínas en las distintas cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (control BY4741, sin genes deletados, Δ ESCRT (Δ vps23, Δ vps24, Δ snf7, Δ vps4), Vps4-MT-HA, Δ pah1 y *wild type* del Δ pah1 (*wt*)) a las 24 y 48 horas de crecimiento para analizar la replicación viral y acumulación de proteínas virales. Como muestra la Figura 26 en las cepas transformadas con las proteínas virales hay niveles adecuados de replicación viral, obteniéndose menor acumulación de ARN viral en los mutantes ESCRT y mayor replicación viral en levaduras Δ pah1.

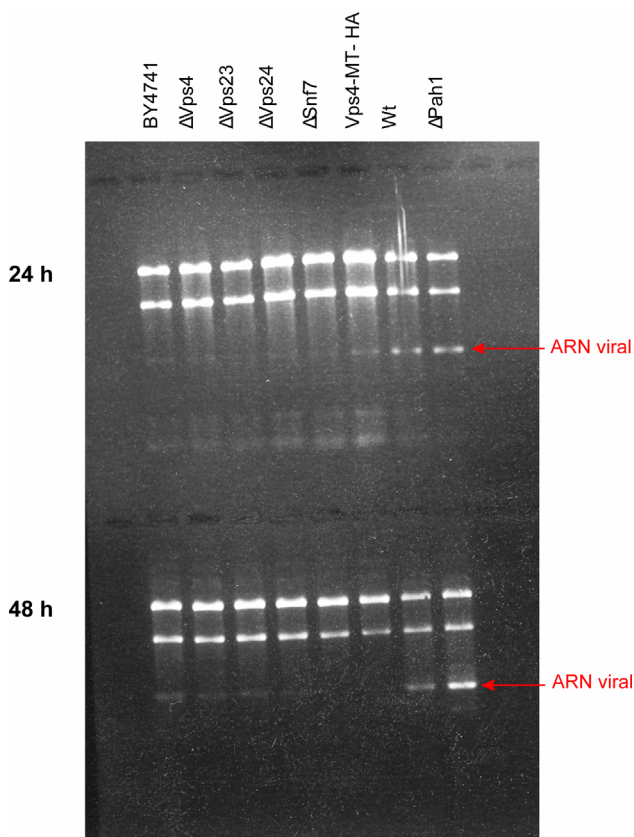


Figura 26. Extracción de ARN en distintas cepas de levadura transformadas con plásmidos que expresan las proteínas virales

Acumulación de ARN ribosómico y viral en levaduras BY474, Δ Vps4, Δ Vps23, Δ vps24, Δ snf7, Vps4-MT-HA, *wt* y Δ pah a las 24 y 48 horas de crecimiento después de la transformación.

Además, se realizó extracción de proteínas y *western blot* también a las 24 y 48 horas de crecimiento (Figura 27). Se detectó la replicasa viral p33 (como se ha visto en Introducción la replicasa de tombusvirus está constituida por dos componentes p33 y p92. Al componente p33 estudiado en este trabajo se le denominará replicasa viral para simplificar) observándose mayor acumulación de proteína viral en la cepa Δ pah1 con respecto a su control *wt* sin delección. Además, como se esperaba, los

mutantes ESCRT mostraron menor cantidad de p33 a las 24 y 48 horas con respecto a BY4741. Estas cepas se diseñaron para clarificar la función de las proteínas ESCRT y Pah1 en la replicación de TBSV y para el estudio del CR de tombusvirus mediante microscopía electrónica.

Aunque a 48 h la acumulación de ARN viral y de proteínas es superior, los ensayos se realizaron a 24 h ya que también se obtenía replicación viral efectiva, y las levaduras se encontraban en fase exponencial de crecimiento, siendo esta fase mas adecuada para los procesamientos de microscopía electrónica debido a las características de la pared celular.

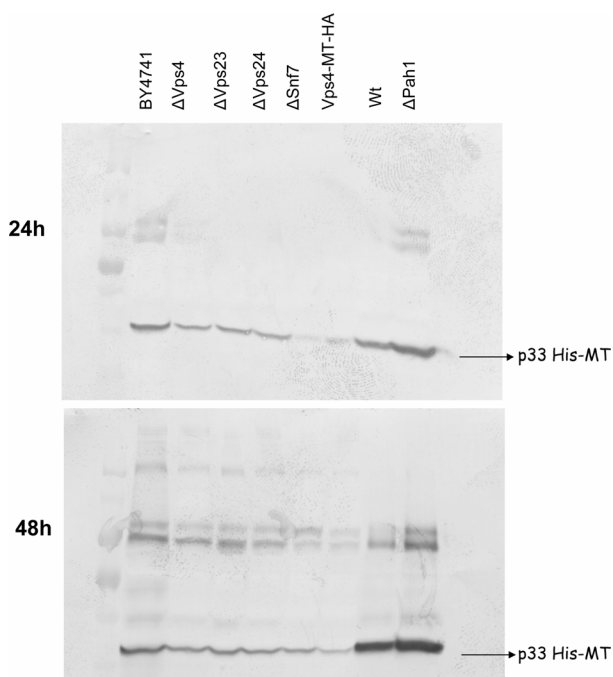


Figura 27. Western blot de células de levadura transformadas con un plásmido que expresa p33-His-MT

Detección de la replicasa viral p33 con un anticuerpo frente a Histidina en células de levadura BY474, ΔVps4, Δvps23, Δvps24, Δsnf7, Vps4-MT-HA, wt y Δpah a las 24 y 48 horas de crecimiento después de la transformación.

1.2. Estudio del CR de TBSV en células de levadura que expresan proteínas y ARN viral

Se procesaron para MET células de levadura que habían sido tratadas con zymolyase® de manera que se obtenía una muestra heterogénea, con células con distinto grado de digestión de la pared celular. Una parte importante de las células procesadas presentaban la totalidad de la pared celular, en las que el citosol era muy denso y no se distinguían orgánulos celulares. Sin embargo, había células en las que la pared se había digerido parcialmente, permitiendo la entrada de los fijadores y agentes de tinción y contraste. En este caso, como muestra la Figura 28 se pueden distinguir diferentes orgánulos en el citosol como: ribosomas, mitocondrias y RE. Las células mostradas en la Figura 28 no expresan las proteínas virales, son utilizadas como control.

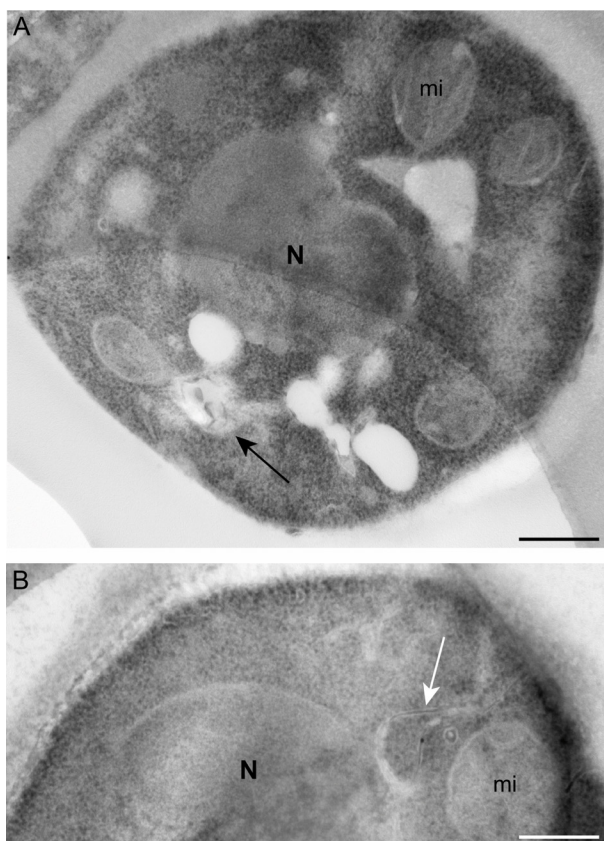


Figura 28. MET de secciones ultrafinas teñidas correspondientes a levaduras BY4741 control

Estas células no expresan las proteínas virales necesarias para la replicación de tombusvirus. Las secciones fueron recogidas en rejillas de carbón con agujeros Quantifoil®. Se distingue el núcleo (N) y orgánulos característicos como mitocondrias (mi) y endomembranas (flechas) pero no se observan vesículas o esférulas. Barras: 100nm.

Una vez ajustada la concentración y el tiempo de incubación con la enzima zymolyase®, se procesaron para MET las cepas de levadura que expresaban las proteínas y el ARN virales. Para estudiar con alta resolución el CR de TBSV se utilizó el método METTEM (Fernández de Castro *et al.*, 2014; Risco *et al.*, 2012). La visualización de los nanoclusters de MT requiere que no se utilicen agentes de contraste durante la inclusión, por ello, no se distinguen membranas con este tipo de procesamiento. Sin embargo, permite observar la distribución de moléculas de proteína alcanzando una resolución molecular, que no se puede obtener con otro tipo de técnicas. Para los ensayos de inmunomarcaje y para la visualización de los clusters de MT se usaron resinas acrílicas, como LR-White, por ser más transparentes a los electrones y menos densas y viscosas que las resinas epoxi. Tampoco se pueden teñir las secciones con agentes de tinción como el acetato de uranilo y el citrato de plomo porque enmascarar los clusters de MT. Se utilizaron, por tanto, protocolos distintos a los convencionales para obtener la información necesaria y caracterizar el CR de TBSV.

Se procesaron cepas de levadura transformadas con plásmidos que expresaban la replicasa viral unida al marcador MT (p33-His-MT). Las células se trataron con HAuCl₄ para que la MT pudiese captar los átomos de oro, plegándose y generando el cluster de oro visible en el microscopio electrónico. De

esta manera se pudo observar la distribución de las moléculas de p33 como nanoclusters de ~1nm de diámetro en células donde el virus se estaba replicando. En la Figura 29A se puede apreciar la distribución de p33, definiendo un compartimento donde se localizaría el CR del virus. En la Figura 29B se muestra una imagen ampliada de dicho compartimento. Para detectar replicación viral se realizaron inmunomarcajes sobre secciones de resina LR-White, utilizando un anticuerpo que reconoce dsRNA, intermediario de la replicación viral. Es un anticuerpo que ha sido utilizado para detectar replicación en varios virus ARN de polaridad positiva (Lukacs, 1994; Schonborn *et al.*, 1991). En la Figura 29C se observa como p33 se distribuye en membranas donde la proteína aun no es activa, y que quizás correspondan con el tráfico intracelular de la proteína. Es en las esférulas de unos 25-50 nm de diámetro donde la proteína es activa, ya que en dichas vesículas se localizan las proteínas y cofactores necesarios para la replicación viral y donde se concentra la señal del inmunomarcaje con anti-dsRNA. Las esférulas formadas por TBSV están definidas por la señal de oro del inmunomarcaje (Figura 29C). Para poder distinguir membranas fue preciso incluir la muestra en resina epoxi e introducir agentes de contraste y tinción, como son el tetróxido de osmio y el acetato de uranilo al 2% (ver protocolo para estudiar ultraestructura en Materiales y Métodos). Además, una vez obtenidas las secciones se tiñeron con acetato de uranilo saturado y citrato de plomo. De esta manera, no se pueden usar anticuerpos, ya que los epítomos han sido destruidos en el procesamiento, pero se pueden distinguir muy bien las membranas y compartimentos subcelulares. Así, en la Figura 29D se observa un compartimento u orgánulo modificado y delimitado por membranas. Probablemente se trate de un peroxisoma modificado por la replicación del virus, aunque también parece estar formado por elementos del RE. En el interior de dicho compartimento se localizan las esférulas de 25-50 nm de diámetro, muy semejantes a las observadas previamente en células de plantas infectadas por tombusvirus (Barajas *et al.*, 2009).

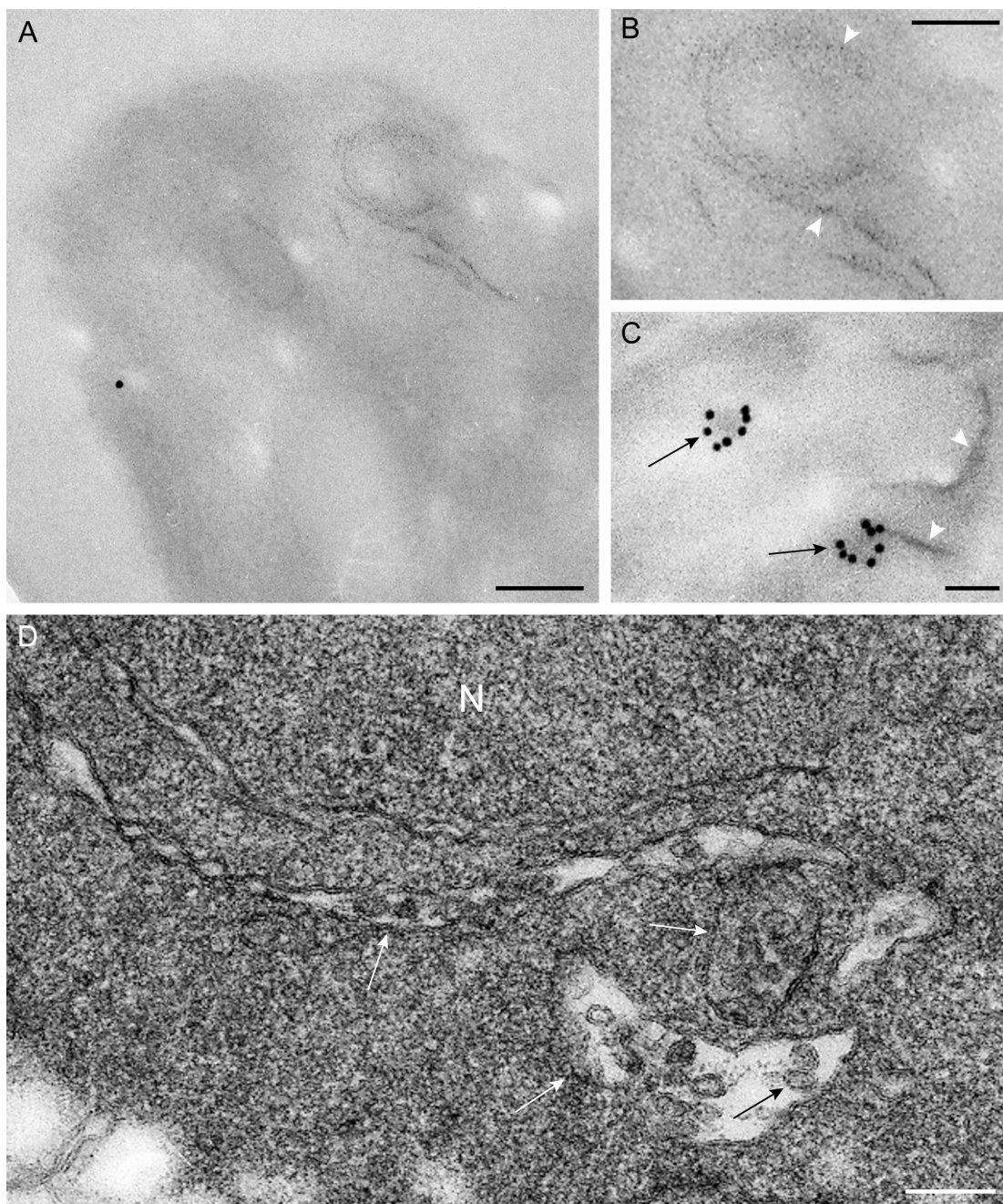


Figura 29. Caracterización del CR de tombusvirus mediante distintas técnicas de MET

A, B y C) Inclusión en resina LR-White de células de levadura tratadas con HAuCl_4 que expresan las proteínas necesarias para la replicación de tombusvirus y el marcador de MT (p33-His-MT), secciones ultrafinas (~ 50 nm) de grosor recogidas en rejillas Quantifoil® sin teñir. A y B) Visualización de p33-His-MT mediante los nanoclusters de MT (puntas de flecha blancas) de aproximadamente ~ 1 nm. C) Inmunomarcaje con anticuerpos primarios específicos frente dsRNA y secundarios conjugados con partículas de oro de 10 nm; esférulas marcadas con el anticuerpo (flechas negras) y membranas donde se encuentra p33-His-MT marcadas por el marcador de MT mediante los clusters (puntas de flecha blancas). D) Inclusión de células de levadura que expresan las proteínas virales en resina epoxi EML-812 con agentes de tinción y contraste. Secciones ultrafinas teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo. Compartimento u orgánulo modificado (flechas blancas) que contiene las esférulas (flecha negra) del virus de 25-50 nm de diámetro. Barras: 100 nm en A y D; 50 nm en B y C.

Mediante inmunomarcaje y MET se localizó también la replicasa viral p33 con un anticuerpo que reconoce el marcador His fusionado a la proteína viral (p33-His-MT). En la Figura 30 se observa una célula de levadura donde se está produciendo gran cantidad de replicasa. En las imágenes de las Figuras 30B, C y D se pueden apreciar los detalles del intenso marcaje en las vesículas o esférulas que constituyen el CR viral. En este caso, las esférulas se observan poco contrastadas y menos definidas que cuando se incluyen con resinas de tipo epoxi. Esto es debido a que las células se han incluido en resina LR-White sin agentes de tinción y contraste para preservar lo mas posible los epítomos de las proteínas. Se adquiere cierto contraste porque las secciones sí están teñidas, después del inmunomarcaje, con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las células de las Figuras 30E y F se procesaron utilizando el protocolo para estudiar la ultraestructura, ya que se pretende estudiar orgánulos celulares y membranas. Es frecuente encontrar mitocondrias en las proximidades del sitio de replicación viral, como ya ha sido descrito para otros virus. Sin embargo, en este caso, también se encontraron muchas células con una gran acumulación de mitocondrias en un punto concreto de la célula. Como se observa en la Figura 30E dicha concentración de mitocondrias aparece, aparentemente, alejada del compartimento donde se encuentran las esférulas. Este es el resultado del análisis de un solo plano, con seriados y reconstrucción 3D se puede obtener una información más completa de la localización de las mitocondrias. El RE también parece ser un elemento importante para la replicación de tombusvirus. Trabajos anteriores demuestran que la replicación del virus se produce también en membranas del RE además del peroxisoma (Nagy *et al.*, 2012). La Figura 30F muestra elementos de RE que conectan con el orgánulo modificado o compartimento que contiene las esférulas. Estos resultados demuestran que la replicasa viral está localizada en las esférulas o CR donde es activa y se lleva a cabo la replicación; pero además se localiza en la membrana del compartimento u orgánulo que contiene las esférulas, y en otras membranas conectadas con dicho compartimento. Además, parece que las mitocondrias y elemementos del RE estarían relacionados con la replicación de tombusvirus.

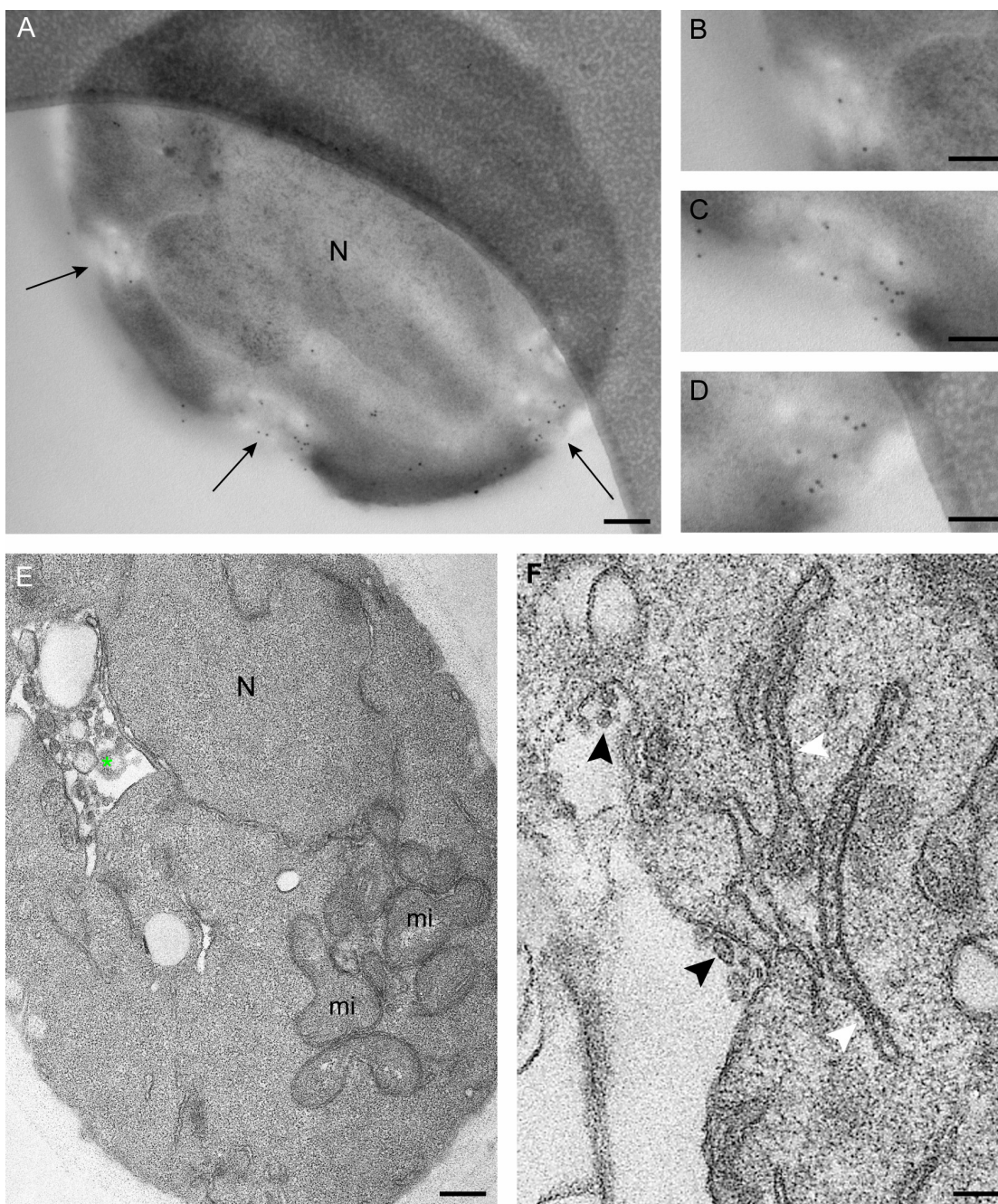


Figura 30. Replicación viral y elementos relacionados con el CR de TBSV

MET de células de levadura que expresan las proteínas virales necesarias para la replicación. A, B, C y D) Inclusión en resina LR-White sin agentes de tinción y contraste, secciones ultrafinas recogidas en rejillas Quantifoil® e inmunomarcaje con anticuerpos primarios específicos que reconocen el marcador de His unido a p33 (p33-His-MT) y anticuerpos secundarios conjugados con partículas de oro de 10 nm. Tinción de las rejillas con acetato de uranilo saturado y citrato de plomo. A) Esférulas virales (flechas) altamente marcadas por el anticuerpo y localizadas en la periferia celular. B, C y D) Imágenes de las esférulas que se muestran en A) a mayor magnificación. E y F) Inclusión en resina epoxi con agentes de tinción y contraste, secciones ultrafinas recogidas en rejillas de cobre 300 y teñidas con acetato de uranilo saturado y citrato de plomo. E) Órgano modificado que contiene las esférulas (asterisco) y acumulación de mitocondrias (mi). F) Esférulas de 25-50 nm de diámetro asociadas con membranas y elementos del RE (puntas de flecha negras y blancas, respectivamente). Barras: 200 nm en A y E; 100 nm en B, C, D, y F.

Para poder analizar un mayor volumen de la célula se recogieron cortes seriados (Figura 31). Generalmente las secciones ultrafinas para MET son de unos 50 nm y muchas estructuras en las células sobrepasan este tamaño; por tanto, se pierde información si sólo se analizan en una sección. En este caso, para estudiar el CR de TBSV se recogieron 7 secciones de (~ 60 nm) en rejillas de ojal con plástico formvar al 0,5%, se tiñeron y se analizaron en el microscopio electrónico. Posteriormente, se obtuvo un modelo 3D que permitió observar las membranas que definen el compartimento u orgánulo modificado, que contienen replicasa viral p33 pero aun no es activa, y las esférulas o CR viral que están integradas en dicho compartimento. Es en las esférulas donde se concentran los elementos necesarios para la replicación viral y donde p33 es activa. Además se observan mitocondrias muy cerca del sitio de replicación viral, las cuales, podrían aportar energía para la propagación del virus. Por lo tanto, el análisis de cortes seriados y el modelo 3D permitieron afirmar que las mitocondrias sí están próximas al orgánulo de replicación. El procesamiento de imágenes y la reconstrucción 3D se realizaron usando los programas: Reconstruct®, ImageJ® y Amira®.

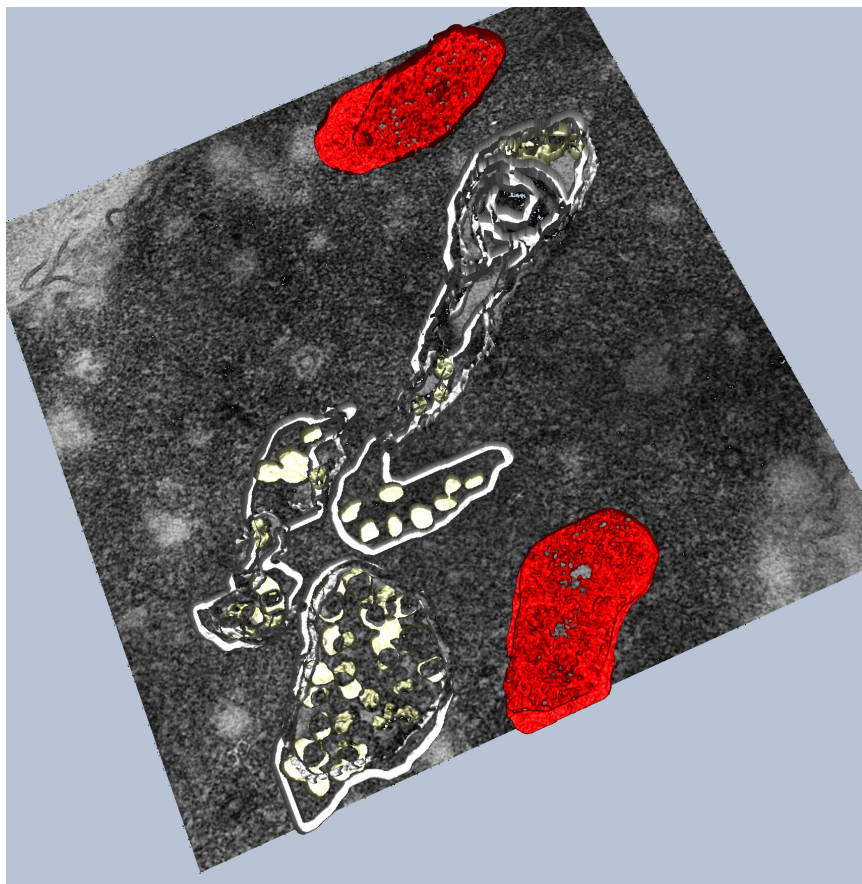


Figura 31. Modelo del complejo replicativo de TBSV en 3D

Células de levadura que expresan las proteínas necesarias para la replicación viral procesadas para el estudio de la ultraestructura. Se recogieron 7 Secciones de ~ 60 nm en rejillas de ojal-cobre con formvar al 0.5% y teñidas con acetato de uranilo saturado y citrato de plomo. Reconstrucción 3D del CR de TBSV en la que se observa el compartimento u orgánulo modificado por la replicación del virus (membranas blancas), en el que se integran las esférulas (amarillo) o vesículas donde tiene lugar la replicación viral. En este modelo se pueden apreciar mitocondrias (rojo) muy cerca del compartimento.

1.3. Caracterización del mutante ESCRT $\Delta vps4$

1.3.1. Colocalización de la proteína Vps4 con dsRNA en el CR de TBSV

Utilizando técnicas de MET se pudo determinar el papel de la proteína Vps4 en la replicación viral. En la Figura 32A se observa el compartimento donde se localizan las esférulas formadas por el virus. Detalles de estas esférulas se muestran en las Figuras 32B y C, ya que están a mayor magnificación. Estas vesículas o esférulas poseen solo una membrana y en la Figura 32B se puede observar como algunas están conectadas a la membrana del compartimento a través de un estrechamiento o "cuello".

Para comprobar si Vps4 estaba localizada en el CR de TBSV, se realizó inmunomarcaje en células de levadura que expresan la proteína Vps4 fusionada al marcador de HA. La detección de la replicasa viral p33 fusionada al marcador MT se realizó usando el método METTEM y el ARN viral se detectó utilizando el anticuerpo frente dsRNA (Figuras 32D y E). Las células están muy poco contrastadas pero se puede visualizar la distribución de las moléculas de p33 con los nanoclusters de MT. Utilizando partículas de oro de distinto tamaño se puede observar por inmunomarcaje como la señal de Vps4 suele aparecer asociada a la de dsRNA y a p33-MT-oro en el interior del CR de tombusvirus (Figuras 32D y E).

Como se ha mencionado anteriormente, las células de las Figuras 32D y E carecen de agentes de tinción y contraste para poder visualizar los nanoclusters de MT. En estas condiciones no se distinguen las membranas intracelulares; sin embargo, algunas membranas pueden visualizarse si después del inmunomarcaje con anticuerpos se tiñen las secciones con acetato de uranilo y citrato de plomo (Figuras 32F-H). En células teñidas se observa como Vps4 y el dsRNA viral están contenidos en compartimentos limitados por membranas (Figuras 32F-H). Estos resultados apoyan que Vps4 es un elemento del CR activo de TBSV.

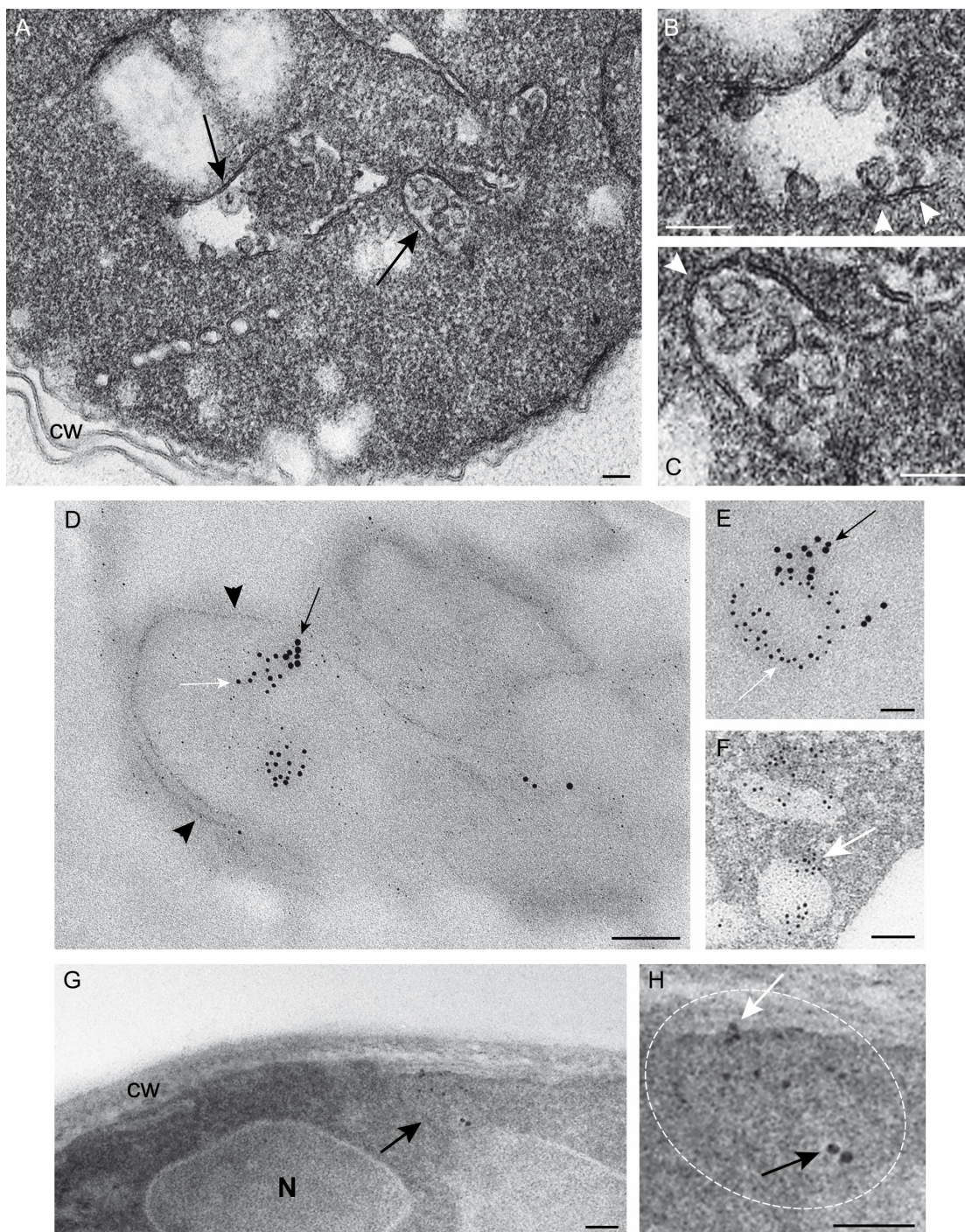


Figura 32. El CR de TBSV ensambla en membranas que contienen p33, dsRNA y la proteína ESCRT Vps4 en la periferia celular

A) MET de secciones ultrafinas teñidas para el estudio de la ultraestructura. Esférulas características integradas en el compartimento u orgánulo modificado en la periferia celular (flechas). En B) y C) se observan las esférulas de la imagen A) con mayor magnificación. Las puntas de flecha señalan los contactos que existen entre las esférulas y la membrana del compartimento. El interior del compartimento parece estar vacío en B), mientras que en C) está lleno de membranas. En D) y E) se muestran los CRs generados por el virus mediante inmunomarcaje, utilizando anticuerpos primarios específicos y secundarios conjugados con partículas de oro de distinto diámetro y METTEM. Secciones ultrafinas de células de levadura que expresan la proteína Vps4 unida al marcador HA (detectada con un anticuerpo anti-HA y partículas de oro de 10 nm,

flechas negras en D) y E)), dsRNA de TBSV (detectado con un anticuerpo anti dsRNA y partículas de oro de 5 nm, flechas blancas en D) y E)) y las moléculas de p33 fusionada con el marcador de MT (nanoclusters de 1 nm de diámetro aproximadamente, asociados al marcador MT, puntas de flecha negras en D)); se estudiaron las secciones sin teñir. P33, dsRNA y Vps4 colocalizan en el mismo compartimento. F-H) Secciones ultrafinas de las mismas muestras de levadura pero teñidas después del inmunomarcaje con acetato de uranilo y citrato de plomo. En estas condiciones no se distinguen los clusters de p33-MT; sin embargo, se pueden visualizar ciertas membranas y compartimentos celulares. Vps4 y el dsRNA están contenidos en estructuras periféricas que podrían ser las esférulas formadas por el virus y descritas en C). F) Las flechas blancas apuntan a las partículas de oro de 5 nm unidas al anticuerpo frente dsRNA. H) Mayor magnificación del compartimento marcado con una flecha en G). El inmunomarcaje muestra colocalización del dsRNA (flecha blanca) y Vps4 (flecha negra). Barras: 50 nm en A, B, C, E, F, G y H; 100 nm en D.

Para optimizar el marcaje de Vps4 se sobreexpresó la proteína con un plásmido que codificaba Vps4 fusionada con HA y MT, en células de levadura que presentaban los elementos necesarios para la replicación viral. Debido a la elevada sensibilidad de la técnica METTEM y a la sobreexpresión de la proteína Vps4, la visualización de Vps4-HA-MT mediante la formación de nanoclusters de 1 nm no dio lugar a resultados claros. Sin embargo, su localización con anticuerpos anti-HA en ensayos de inmunomarcaje produjo señales claras e intensas. Esta aproximación permitió la observación mediante inmunomarcaje y MET de Vps4 muy cerca del dsRNA. Como muestran las Figuras 33 y 34, las esférulas se encuentran localizadas en el interior del compartimento delimitado por membranas donde se concentran las señales de Vps4 y dsRNA. El compartimento u orgánulo modificado se encuentra rodeado de mitocondrias y también se observan múltiples membranas, algunas de ellas correspondientes a RE. La colocalización (proximidad de las señales basada en los resultados del inmunomarcaje-MET) de Vps4 y dsRNA en células de levadura sugiere un reclutamiento de Vps4 al CR activo durante la replicación viral.

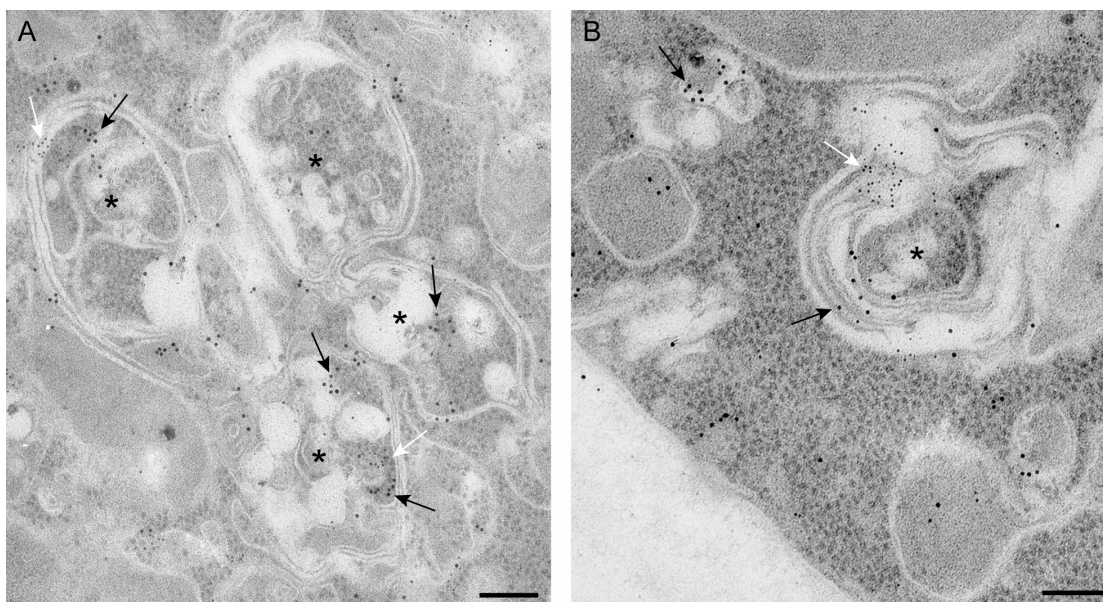


Figura 33. Estudio del CR de TBSV en levaduras que expresan p33, dsRNA y la proteína ESCRT Vps4 fusionada a los marcadores de HA y MT

A) y B) Organización general del compartimento membranoso que contiene las esférulas inducidas por la replicación viral, inmunomarcaje sobre secciones ultrafinas teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo. Vps4-MT-HA se detectó con un anticuerpo específico frente HA y un secundario conjugado con partículas de oro de 10 nm (flechas negras), mientras que el dsRNA se detectó con un anticuerpo primario específico y partículas de oro de 5 nm (flechas blancas). Los asteriscos marcan el centro de distintas áreas del compartimento complejo donde están las esférulas virales y donde se concentra la señal de Vps4 y de dsRNA. Barras: 100 nm.

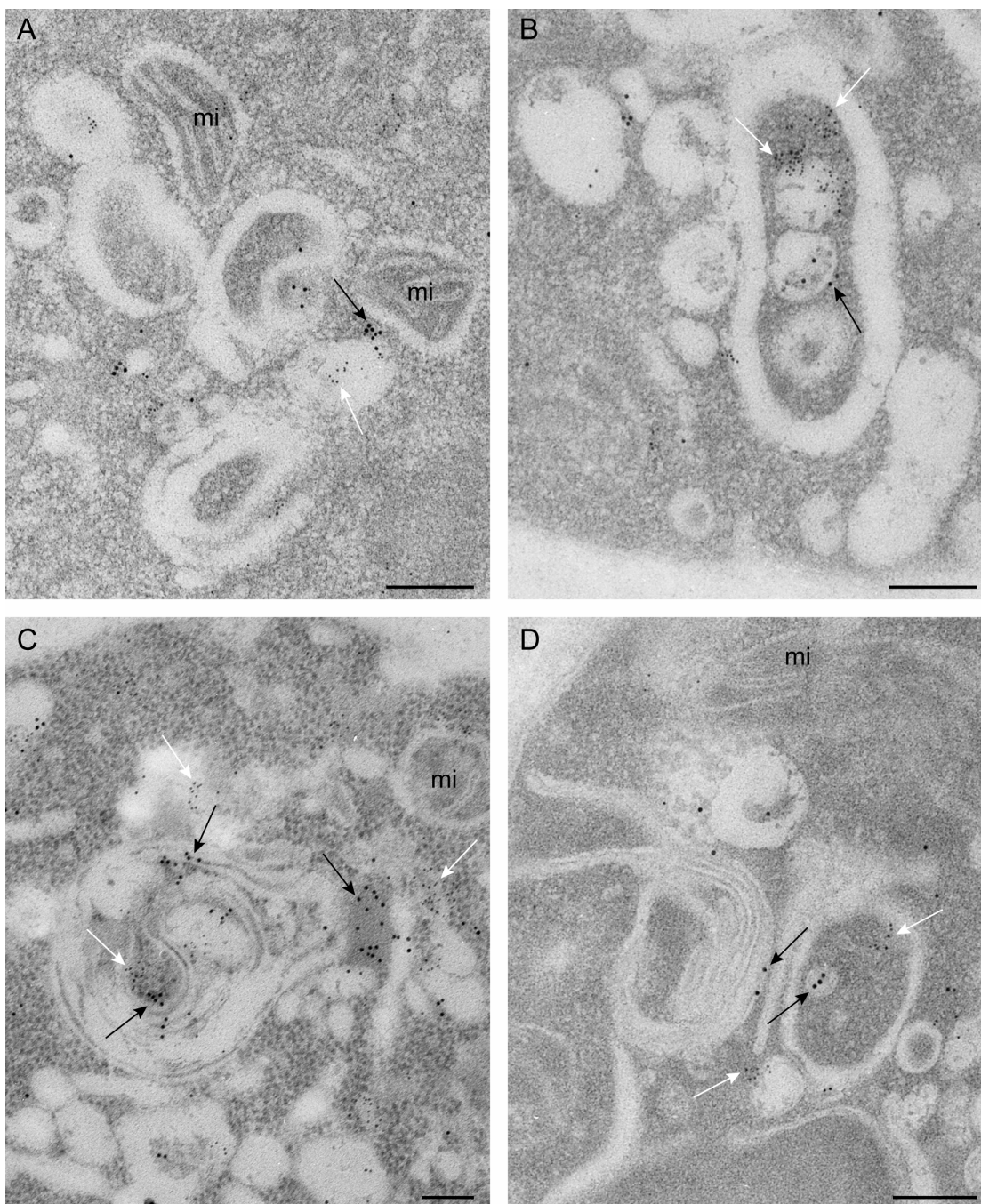


Figura 34. Detalles del compartimento membranoso con esférulas virales ensambladas en levaduras que expresan p33, dsRNA y la proteína ESCRT Vps4-MT-HA

Para la detección de Vps4-MT-HA (partículas de oro de 10 nm, flechas negras) y el dsRNA (partículas de oro de 5 nm, flechas blancas), se procesaron las muestras para inmunomarcaje con anticuerpos específicos y conjugados con oro coloidal. Las secciones ultrafinas se tiñeron para poder distinguir membranas y orgánulos celulares. A) Los compartimentos que contienen el CR están rodeados por mitocondrias (mi). B-D) Se observan compartimentos u orgánulos modificados que contienen las esférulas de unos 70 nm de diámetro y que contienen Vps4 y dsRNA. El compartimento conecta con un sistema complejo de membranas (C y D). Barras: 100 nm.

1.3.2. Función de la proteína Vps4 en el ensamblaje del CR de tombusvirus

Para visualizar el CR de TBSV en células de levadura que carecen de la proteína Vps4 ($\Delta vps4$), se estudió por MET la cepa $\Delta vps4$ que expresaba los elementos necesarios para la replicación viral. Es interesante observar que las esférulas formadas por $\Delta vps4$ (Figuras 35C y D), que expresa las replicasas virales p33 y p92 y el ARN viral, son distintas a las esférulas características formadas por la levadura control sin delección del gen *vps4* (Figuras 35A y B). En la cepa $\Delta vps4$, cuando se aportan las proteínas virales necesarias, TBSV sí es capaz de replicar, aunque lo hace con menor eficacia que en la levadura control. Las estructuras mostradas en las Figuras 35C y D parecen esférulas incompletas que no llegan a cerrarse, presentando amplias aperturas pero que contienen las replicasas virales (ver más adelante Figura 36). Las células de levadura control, que no expresan los elementos de replicación viral, carecen de este tipo de estructuras (tanto de las esférulas características como de las vesículas incompletas o abiertas que se aprecian en $\Delta vps4$) (Figura 28). Por lo tanto, parece que las replicasas de tombusvirus no pueden inducir la formación de esférulas completas en la cepa $\Delta vps4$. La forma de dichas esférulas es muy distinta a la que muestran las levaduras control que expresan las proteínas necesarias para la replicación viral.

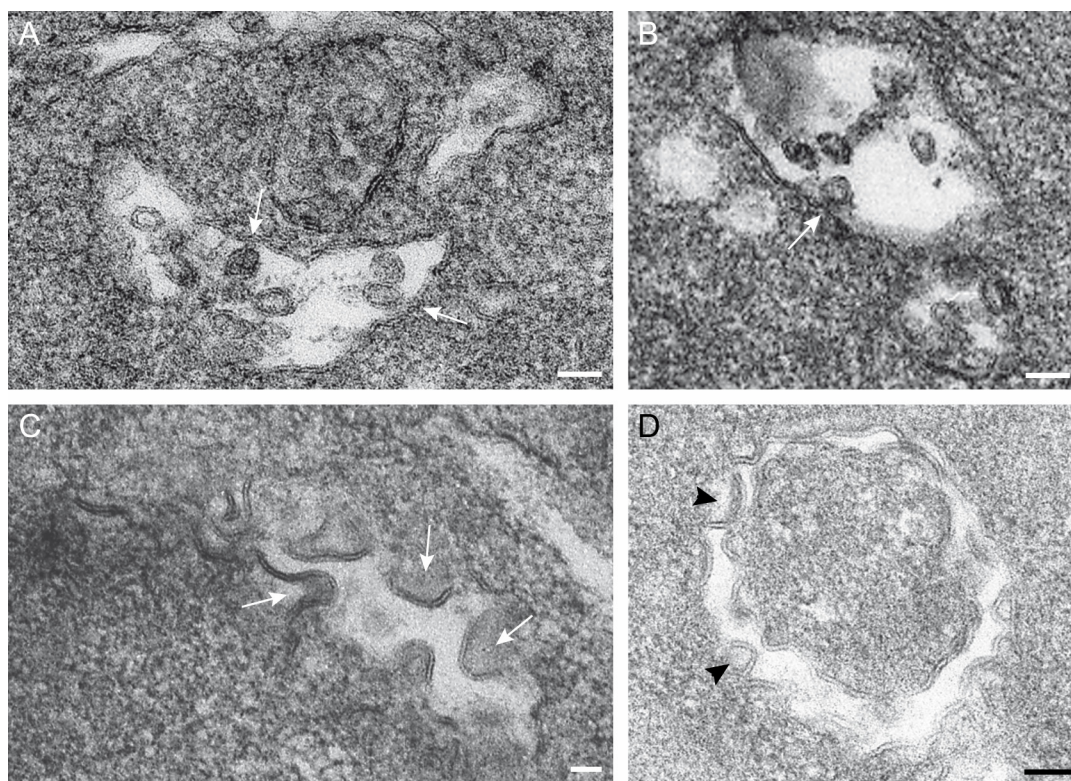


Figura 35. La proteína Vps4 es requerida para la formación de esférulas en levadura

Secciones ultrafinas teñidas de células de levadura donde replica TBSV y que han sido procesadas para su análisis ultraestructural. A) y B) Levadura control con los compartimentos membranosos característicos de la replicación de tombusvirus y que contienen las esférulas en su interior. Las flechas apuntan a conexiones (a través de la constricción de la esférula o cuello) entre las esférulas y la membrana del compartimento intracelular. C) y D) Compartimento membranoso en la periferia celular de *Δvps4*. Se observan vesículas abiertas en el lumen del compartimento, no se observa la constricción o cuello de la esférula sino que parecen abiertas al citosol (flechas en C y puntas de flecha en D). Barras: 50 nm.

Para localizar la replicasa viral p33 en membranas intracelulares se utilizó el método METTEM en células de levadura que expresaban la replicasa viral fusionada al marcador MT (p33-His-MT). La distribución de moléculas de p33 en *Δvps4* define estructuras abiertas y elongadas (Figura 36A), esférulas que han perdido su morfología, si se comparan con las estructuras esféricas que aparecen en la levadura control con proteínas virales (Figura 36B). Además, las estructuras del *Δvps4* parecen no estar conectadas con membranas, el cuello de la esférula se ha perdido en estas estructuras, si se compara con las vesículas características de la replicación de TBSV (Figuras 36A y 36B). Estos resultados demuestran que Vps4 es requerida para la formación de esférulas características en células de levadura. Como se observa en la Figura 36C, la señal de dsRNA obtenida en el *Δvps4* mediante inmunomarcaje es débil, lo que se corresponde con el menor grado de replicación viral que muestran los mutantes ESCRT con respecto a la levadura control, con proteína Vps4 (BY4741, Figura 26). Estos resultados sugieren que en ausencia de Vps4, aunque se ensamblen CRs con morfología distinta, son funcionales y capaces de llevar a cabo cierta replicación viral. Por tanto, la replicación viral en *Δvps4* es menos eficaz que en el control; es posible que el ARN viral esté menos protegido en estas estructuras abiertas y sea mas sensible a la degradación por nucleasas.

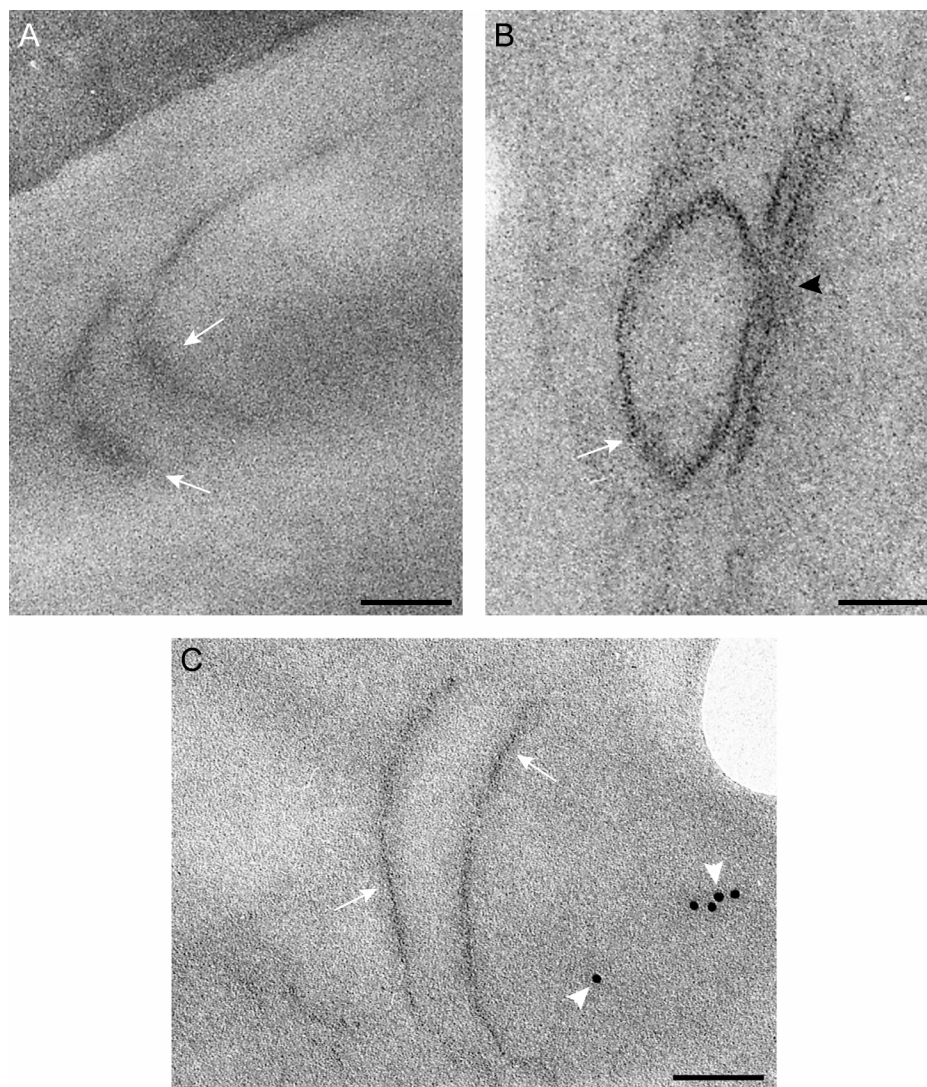


Figura 36. Detección del marcador de MT fusionado a la proteína p33 en levadura control y en $\Delta vps4$

Se procesaron células de levadura tratadas con HAuCl_4 que expresaban las proteínas necesarias para la replicación de TBSV para realizar inmunomarcaje y visualización de los clusters de MT. A) Pequeños nanoclusters asociados a p33-MT revelan la presencia de la replicasa viral en vesículas abiertas o estructuras con membranas alargadas (flechas) en la periferia celular de $\Delta vps4$. B) En el control las moléculas de p33-MT (flecha) se concentran en vesículas o esférulas integradas en un compartimento membranoso en la periferia celular. La punta de flecha negra señala la conexión que existe entre la esférula y el compartimento membranoso. C) Inmunomarcaje con anticuerpo primario anti dsRNA y secundario conjugado con partículas de oro de 10 nm en secciones ultrafinas no teñidas de $\Delta vps4$. Se detectó una señal leve de dsRNA (puntas de flecha blancas) en membranas periféricas donde están presentes las moléculas de p33-MT. Barras: 50 nm.

1.4. Papel de otras proteínas ESCRT en ensamblaje del CR de tombusvirus

Con distintas técnicas de MET se procesaron células de levadura que expresaban los componentes necesarios para la replicación de TBSV pero donde ciertas proteínas ESCRT habían sido delecionadas ($\Delta vps23$, $\Delta vps24$, $\Delta snf7$ y $\Delta vps4$ (caracterizada en el apartado anterior)). En la Figura 37 se muestra la ultraestructura de los distintos mutantes ESCRT (Figuras 37A, 37C, 37E y 37G) y también el

resultado obtenido al procesar las células para inmunomarcaje utilizando un anticuerpo anti dsRNA y, posterior visualización de los clusters de p33-MT (Figuras 37B, 37D, 37F y 37H) en secciones no teñidas mediante METTEM. En el caso de las cepas $\Delta vps24$ y $\Delta vps4$ se puede observar que los fenotipos son muy semejantes (Figuras 37A y 37G) parece que en ambos casos no se obtienen las esférulas características sino vesículas abiertas o esférulas incompletas. Las cepas $\Delta snf7$ y $\Delta vps23$ presentaron un fenotipo parecido pero muy distinto al de los otros mutantes ESCRT o al control sin delección. En este caso, se observaron acumulaciones de membranas semejantes a lamelas muy densas a los electrones por su alto contenido lipídico, y conjuntos de membranas mas alargadas que parecían derivar del RE (Figuras 37C y 37E). Estos resultados demuestran que las proteínas ESCRT son necesarias para el correcto ensamblaje y formación de las esférulas virales, en células de levadura que expresan las proteínas necesarias para la replicación de TBSV. Parece que estas proteínas son necesarias para la reorganización o remodelación de membranas intracelulares que dan lugar a las esférulas o vesículas características. Varias proteínas ESCRT podrían ser claves en la formación del cuello de la esférula, a través del cual se establece la conexión de la vesícula con la membrana del compartimento en el que se encuentran y se produce la comunicación con el citosol.

En las Figuras 37B-37H, se muestra que los sitios de replicación viral (mostrados por la señal de dsRNA) se encuentran, probablemente, en las mismas membranas que las moléculas de p33-MT. Ambas señales se visualizan muy próximas mediante MET, porque las membranas han sido cortadas por distintas zonas o con diferentes orientaciones. Los nanoclusters de p33-MT se distribuyen en membranas alargadas o incluso en áreas algo mas dispersas (Figuras 37D y 37H) pero no se han detectado las esférulas características del control sin delección (Figura 36B). Por lo tanto, los mutantes ESCRT parecen ser capaces de ensamblar CRs activos cuando se les proporcionan los elementos necesarios, soportando ciertos niveles de replicación viral, aunque la replicación sea menos efectiva que en el control. Además, estos datos señalan que las proteínas de replicación viral de tombusvirus no son capaces de inducir la formación de esférulas completas en los mutantes ESCRT. Por lo tanto, ciertas proteínas celulares, como las proteínas ESCRT son necesarias para ensamblar el CR característico de TBSV en esférulas o vesículas integradas en un compartimento y unidas a la membrana del compartimento a través de una constricción o cuello.

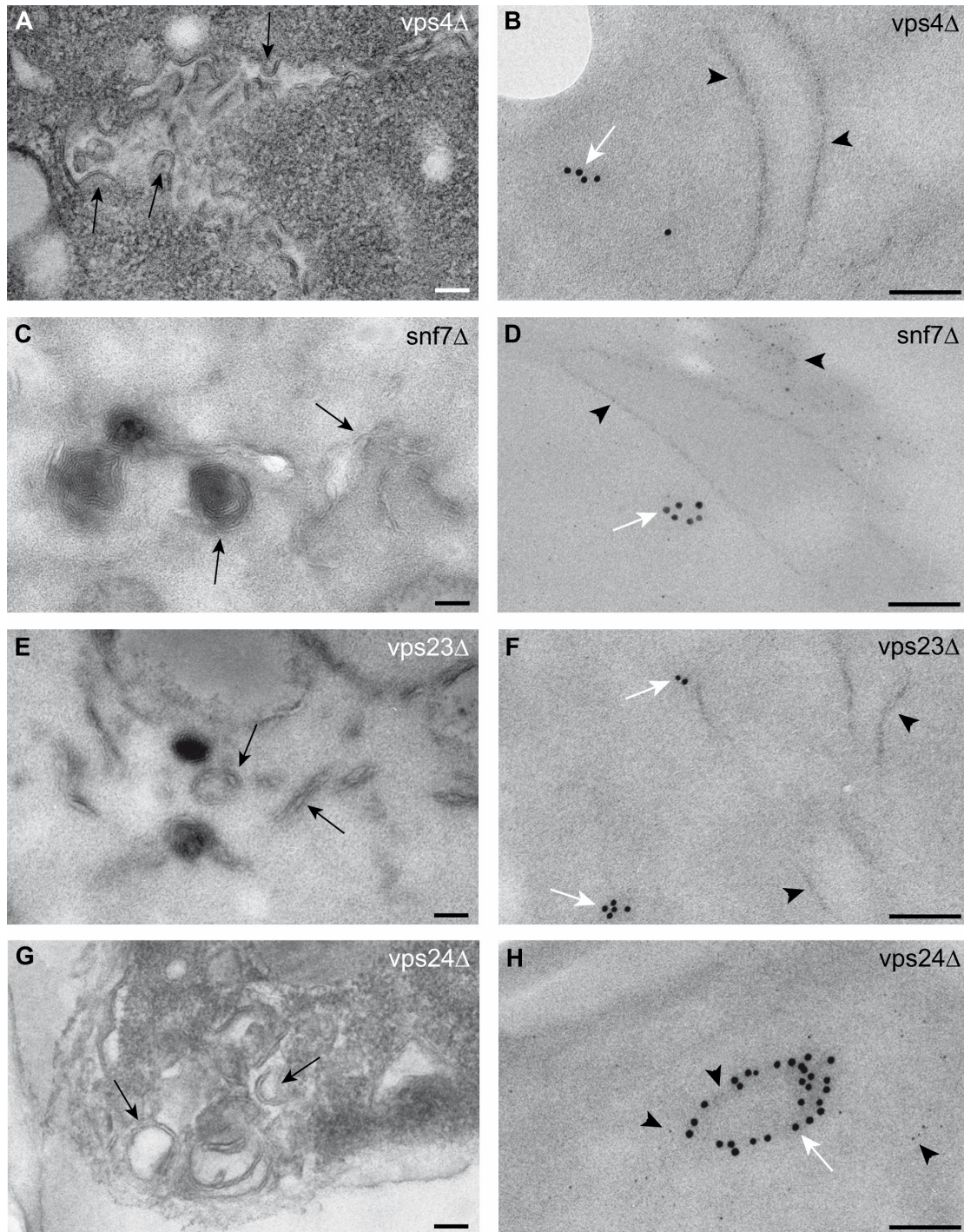


Figura 37. Ausencia de esférulas características de tombusvirus en levaduras Δ ESCRT

A, C, E y G) MET de secciones ultrafinas de células de levadura que expresan los elementos necesarios para la replicación de tombusvirus, teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo para el estudio de la ultraestructura. A y G) las flechas apuntan a esférulas o vesículas incompletas presentes en el interior de un compartimento membranoso localizado en la periferia celular de $\Delta vps4$ y $\Delta vps24$. En el citosol de $\Delta snf7$ y $\Delta vps23$ (C y E) se observa una acumulación de membranas muy densa a los electrones, a veces con forma esférica, y fragmentos de membrana que parecen provenir de RE (flechas). B, D, F y H) Distribución de la replicasa de TBSV (p33-MT) y del dsRNA viral se observaron mediante METTEM e inmunomarcaje en levaduras $\Delta vps4$, $\Delta snf7$, $\Delta vps23$ y $\Delta vps24$. B, D, F y H) Secciones ultrafinas no teñidas. El dsRNA viral (flechas blancas) se detectó con un anticuerpo primario específico y un secundario conjugado con partículas de oro de 10 nm.

La replicasa viral p33-MT se localizó mediante los nanoclusters de oro (~ 1 nm) asociados a la MT (puntas de flecha). Se encontró que p33 y el dsRNA viral se localizaban en el mismo compartimento en la periferia de la célula. Barras: 100 nm.

1.5. Estudio del CR de TBSV en células de levadura donde el gen *pah1* ha sido deletado

1.5.1. La ultraestructura cambia considerablemente en levaduras *Δpah1*

Se utilizaron cepas de levadura que carecían de las proteínas Pah1 y Nem1. La proteína Pah1 es una fosfatasa dependiente de magnesio que cataliza la desfosforilación de ácido fosfatídico produciendo diacilglicerol. Es una proteína importante para la síntesis de fosfatidilcolina, fosfatidilserina y triglicéridos. Por otro lado, el complejo formado por Nem1/Spo7 (subunidad catalítica y subunidad reguladora, respectivamente) cataliza la activación por desfosforilación de Pah1 en las membranas del RE. Al ser levaduras que carecen de las dos proteínas (Pah1 y Nem1) se puede asegurar que no presentan actividad de la proteína Pah1. Estas levaduras fueron estudiadas por MET y se observó que presentaban una gran extensión de la membrana nuclear y del RE (Siniosoglou, 2009). Además, como se puede observar en las Figuras 26 y 27, en la cepa *Δpah1* la replicación de tombusvirus y la acumulación de replicasa viral es superior que en el *wild type* (*wt*, levaduras donde el gen *pah1* no ha sido deletado). Es interesante estudiar esta cepa de levadura para clarificar el papel de Pah1 y de los lípidos en replicación de TBSV. Además, al ser una cepa en la que el virus replica de forma más eficaz, es interesante estudiar el ensamblaje del CR ya que facilita considerablemente los estudios de MET.

Se procesaron células de levadura que expresaban los elementos necesarios para la replicación de TBSV para estudiar la ultraestructura. Las células se incluyeron en resina epoxi introduciendo tetróxido de osmio y acetato de uranilo al 2% como agentes de contraste. Se obtuvieron secciones ultrafinas que se recogieron en rejillas de cobre y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. En la Figura 38 se puede comparar la ultraestructura de la levadura *Δpah1* con el *wt*, en las Figuras 38A y 38B se observa que en *Δpah1* existe una gran proliferación de las membranas del RE. Además, frecuentemente el núcleo de la célula aparece fragmentado (Figura 38B) y el citosol presenta muchas vesículas. En la cepa *wt* se observan orgánulos característicos como mitocondrias, RE o ribosomas; y el núcleo posee la morfología típica de las células de levadura (Figura 38D). Aunque sean cepas que expresan los elementos necesarios para la replicación de tombusvirus, estos cambios en la ultraestructura no son inducidos por el virus, ya que células *Δpah1* sin proteínas virales presentaron la misma ultraestructura (Figura 38C). Sin embargo, sí parece que el virus se sirve de la proliferación de membranas del *Δpah1* para replicarse de forma más efectiva.

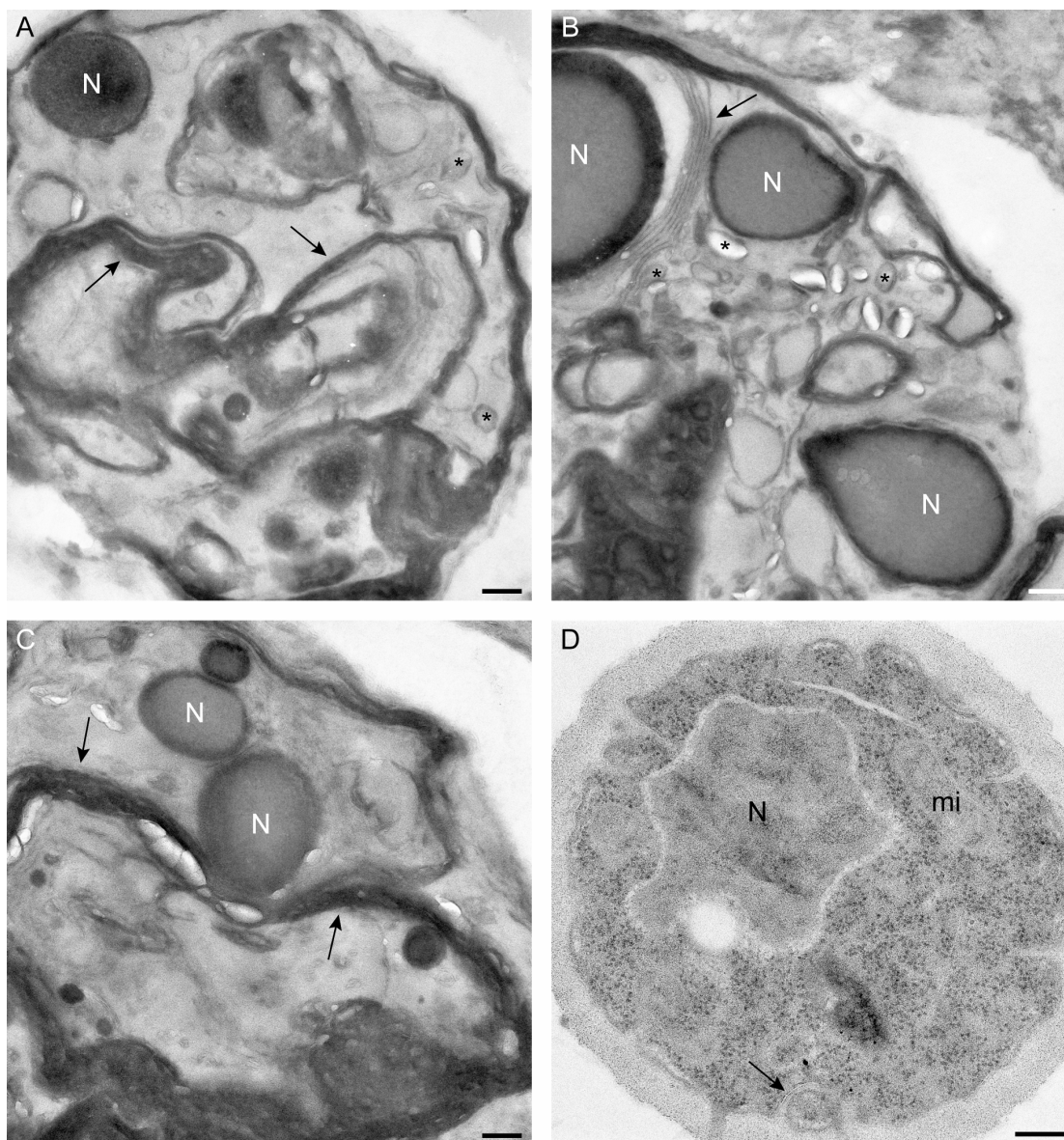


Figura 38. Ultraestructura de la cepa de levadura *Δpah1* y del *wild type*

A y B) MET de secciones ultrafinas teñidas de la levadura *Δpah1* que expresa los elementos necesarios para la replicación de TBSV. El núcleo (N) de estas células está fragmentado y el citosol presenta gran cantidad de vesículas (asteriscos). Además se observa una gran extensión de las membranas del RE (flechas). C) Levadura *Δpah1* no transformada (no expresa los elementos necesarios para la replicación de TBSV) y procesada para el estudio de la ultraestructura. Se observa una gran proliferación del RE, semejante a la de los paneles A y B; el núcleo también está fragmentado. D) MET de secciones teñidas de una célula de levadura *wild type*. Se puede distinguir el núcleo característico (N); y orgánulos celulares como: mitocondrias (mi), membranas de RE (flecha) y ribosomas. Barras: 200 nm.

1.5.2. Modelo 3D del CR de tombusvirus en levaduras *Δpah1*

Para estudiar el CR de tombusvirus se obtuvieron secciones seriadas y se realizó reconstrucción 3D (Figura 39) para poder obtener información más completa del complejo. Como se ha explicado en un apartado anterior, las secciones de MET suelen ser de 50-60 nm de grosor y existen complejos

macromoleculares (como el CR de muchos virus) que son de mayor tamaño. Si se recogen varios cortes seguidos (serie) y se obtiene la reconstrucción 3D, se pueden detectar elementos o contactos de difícil visualización. En la Figura 39 se aprecian varias vistas de una reconstrucción 3D del CR de TBSV en levaduras *Apah1*. La superposición de la reconstrucción 3D sobre la imagen en 2 dimensiones (2D) aporta información sobre el tamaño y localización del CR en la levadura (Figura 39A). Se pueden apreciar esférulas o vesículas integradas en un compartimento membranoso y conectadas con RE (Figura 39B). Si se gira la reconstrucción 3D y se oculta el compartimento membranoso, se pueden distinguir mejor las esférulas y su conexión al RE (Figura 39C). Los resultados sugieren que en la levadura *Apah1* también existen vesículas que sostienen la replicación viral (ver apartados siguientes), pero en este caso, las membranas del RE parecen constituir un elemento fundamental del compartimento.

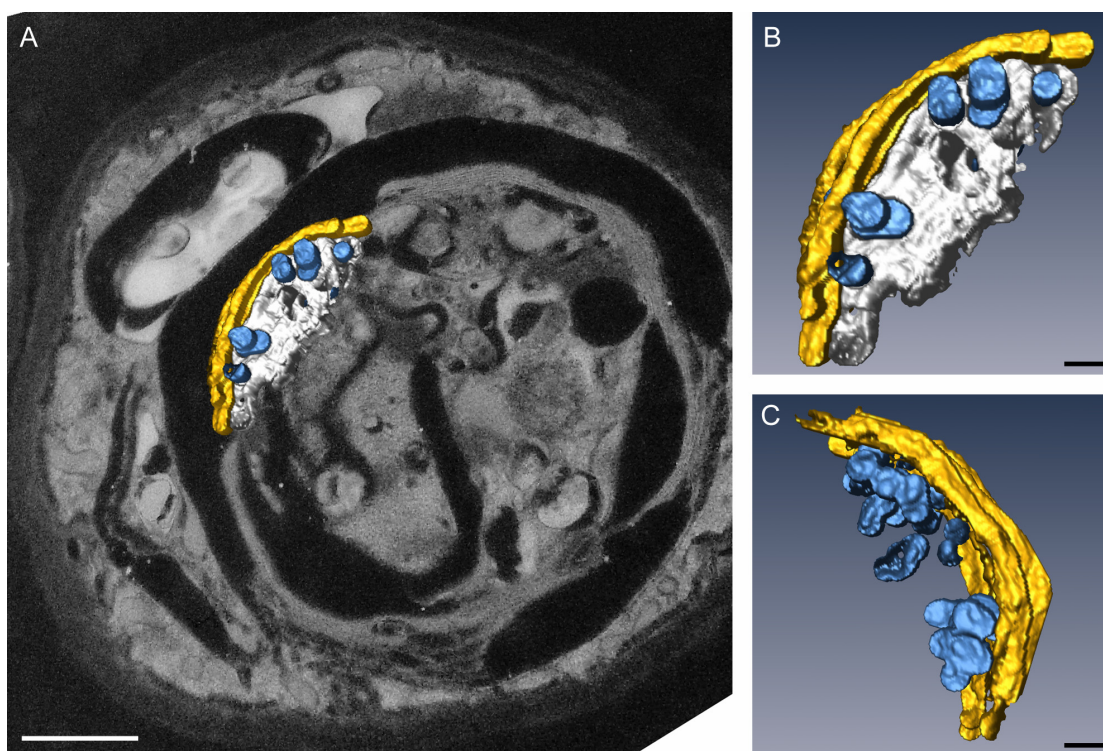


Figura 39. Modelo del orgánulo de replicación de levaduras *Apah1* en tres dimensiones

La visualización del orgánulo de replicación se realizó con MET de secciones seriadas y reconstrucción 3D. A) El volumen fue superpuesto sobre una de las imágenes 2D de la serie. CRs o esférulas virales (azul) se concentran en un compartimento de mayor tamaño (blanco) y están conectadas con membranas del RE (amarillo). B) Vista ampliada del volumen del panel A sin la imagen 2D. C) Rotación de la reconstrucción, donde se ha omitido el compartimento membranoso, para una mejor visualización de los contactos que existen entre las esférulas virales y el RE. Barras: 500 nm en A; 100 nm en B y C.

Para verificar que el compartimento asociado a RE mostrado es el CR de tombusvirus, se realizó inmunomarcaje con el anticuerpo específico que reconoce dsRNA. Se recogieron cortes seriados de levaduras *Δpah1* que expresan los elementos necesarios para la replicación de TBSV, incluidas en resina acrílica LR-White para poder realizar inmunomarcajes. Los cortes presentaron unos 60 nm de grosor y se recogieron en rejillas de barras paralelas y formvar al 0,5%. Se pretendía detectar marcaje con dsRNA en distintas zonas del mismo compartimento para confirmar que se trata del sitio de replicación viral y poder estudiar dónde los CRs son más activos. La Figura 40 muestra que la replicación viral se concentra en un compartimento u orgánulo modificado que está en contacto con el RE. Además, también se encuentra señal dsRNA en las membranas del retículo. El marcaje con dsRNA del mismo compartimento en secciones seriadas confirma que esta es la organización del orgánulo de replicación de TBSV en *Δpah1*, y que la zona de mayor actividad en replicación coincide con las membranas subyacentes al RE, donde se localizan las esférulas.

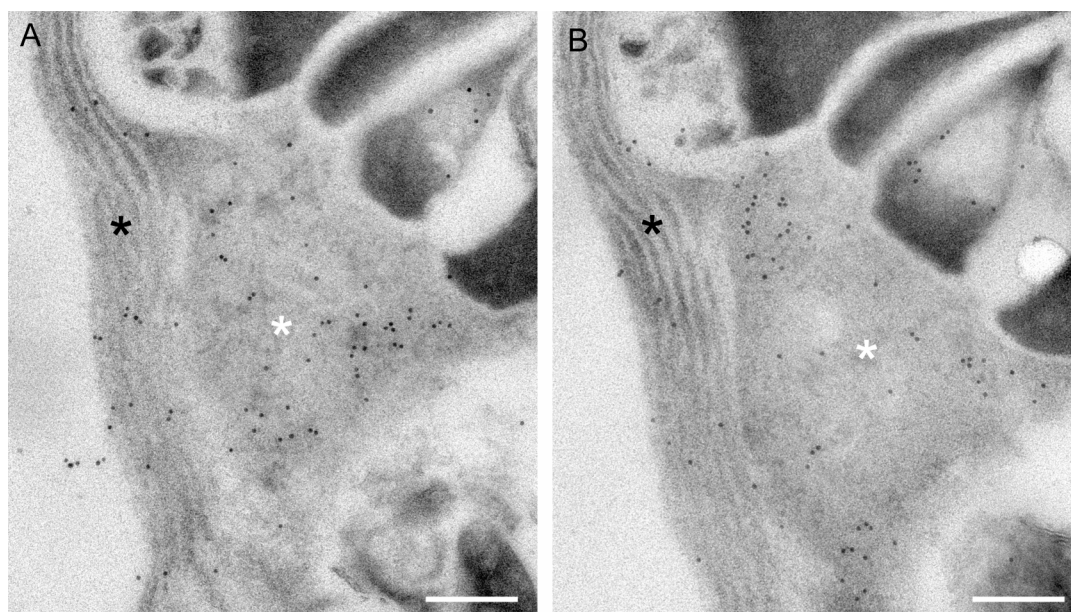


Figura 40. Las esférulas virales se localizan en un compartimento asociado con el RE

Secciones seriadas de levaduras *Δpah1* que expresan los elementos necesarios para la replicación viral, incluidas en resina LR-White sin agentes de contraste. Los cortes de ~60 nm de grosor, se recogieron en rejillas de barras paralelas con formvar al 0,5%. Se detectó dsRNA utilizando un anticuerpo primario específico y un secundario conjugado con partículas de oro de 10 nm. Las rejillas se tiñeron con acetato de uranilo saturado y citrato de plomo. A y B) Compartimento que contiene las esférulas (asterisco blanco) asociado con RE (asterisco negro). Replicación viral, detectada por el marcaje con dsRNA, se concentra en el orgánulo modificado con esférulas y en menor medida en el RE. Barras: 100 nm.

1.5.3. Localización de la replicasa viral mediante METTEM en levaduras *Δpah1*

Se procesaron levaduras *Δpah1* que expresaban el marcador de MT unido a la replicasa viral p33 (p33-His-MT), para estudiar la distribución y localización de la proteína viral. Las células se trataron

con oro e incluyeron en resina LR-White y no se introdujeron agentes de contraste, que enmascaran los clusters de oro de MT. Por ello, en estas muestras no se distinguen membranas ni orgánulos celulares, pero permiten observar las moléculas de p33. En las Figuras 41A y B se puede apreciar el compartimento de replicación de tombusvirus definido por las moléculas de p33-MT. La replicasa viral está integrada en las membranas del compartimento (Figura 41A) describiendo un área extensa dentro de la célula. En la Figura 41B se observaron clusters de p33-MT de mayor tamaño que indican un mayor empaquetamiento de las moléculas de MT y la formación de clusters de oro con la contribución de varias MTs (Fernández de Castro *et al.*, 2014). Además, se detectaron membranas características del RE definidas por los clusters de p33-MT (Figura 41B), por lo tanto, existe un reclutamiento de la replicasa viral al RE. En la Figura 41C se muestra el detalle de un compartimento esférico con p33-MT integrada en las membranas y con clusters de oro de mayor tamaño en su interior. Se utilizó el anticuerpo frente dsRNA para detectar replicación viral. Como se puede observar en la Figura 41D, la replicación de tombusvirus se concentra en un área con vesículas o esférulas definidas por los clusters de p33-MT. Estos resultados demuestran que en la cepa *Δpahl* la replicasa viral p33 se integra en membranas definiendo un compartimento donde se encuentran las esférulas virales y se lleva a cabo la replicación viral. Además, p33-MT se inserta también en membranas del RE que están conectadas al orgánulo de replicación. Los clustres de p33-MT definen un compartimento de gran tamaño, encontrándose además distintos tamaños de clusters. Se observaron clusters de p33-MT más grandes que podrían indicar mayor número de moléculas de MT y mayor grado de empaquetamiento.

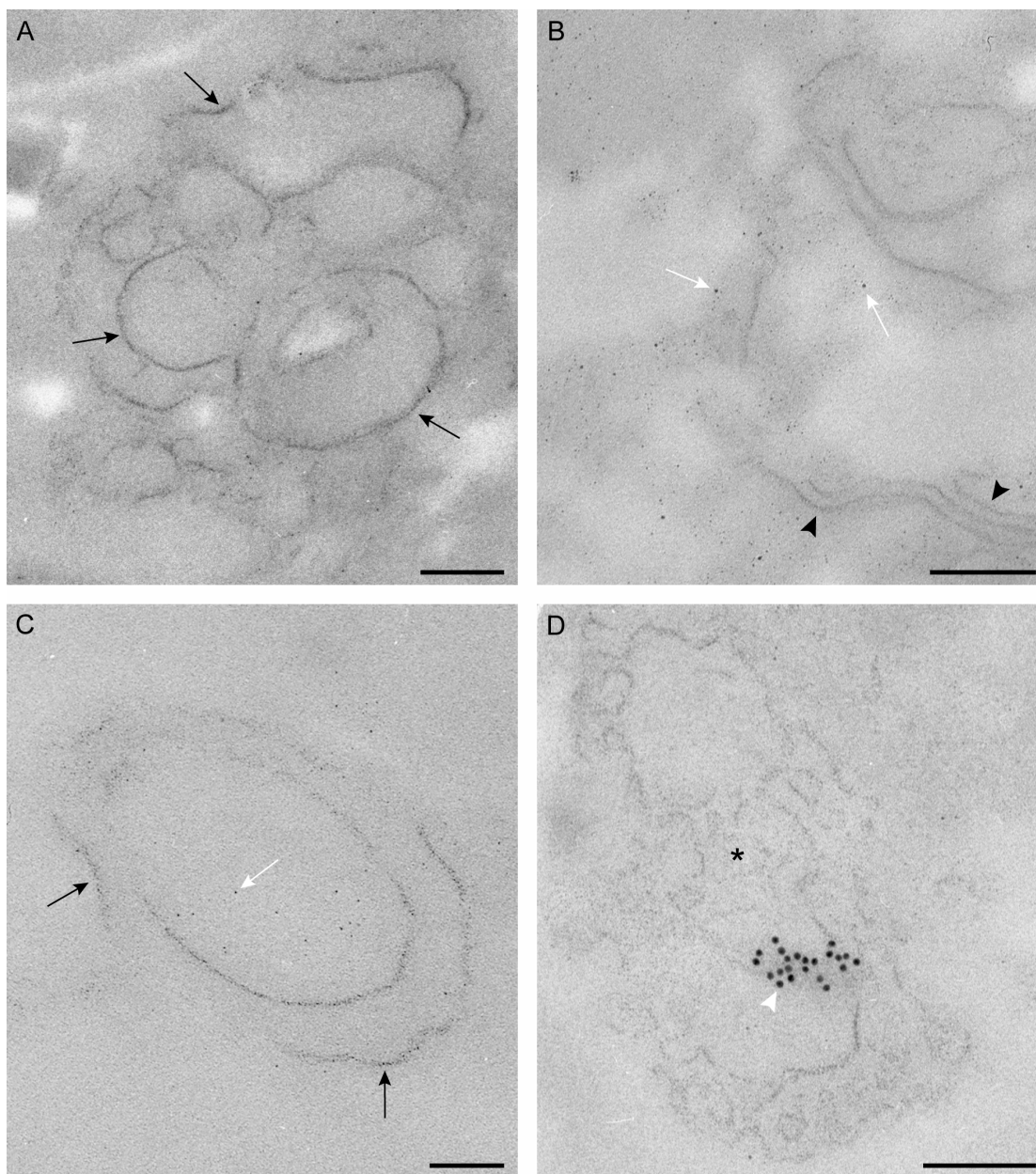


Figura 41. Orgánulo de replicación de TBSV ensamblado en levaduras *Δpah1* y definido por los nanoclusters de p33-MT

A, B y C) Distribución de la proteína de replicación viral p33-MT en secciones ultrafinas de MET sin teñir. Las flechas negras señalan la organización de los clusters de oro de p33-MT en membranas, definiendo el entramado membranoso. RE altamente marcado (puntas de flecha negras) por las moléculas de p33-MT está conectado y formando parte del orgánulo de replicación. Las flechas blancas apuntan a nanoclusters individuales de p33-MT. En el panel C) CR con clusters de oro de mayor tamaño en su interior, definido por la replicasa viral p33. D) Inmunomarcaje para la detección de dsRNA (partículas de oro de 10 nm, punta de flecha blanca) sobre sección ultrafina sin teñir. Acumulación de vesículas y membranas (asterisco) marcadas con el anticuerpo frente dsRNA (punta de flecha blanca). Barras: 100 nm.

1.5.4. En levaduras *Δpah1* el RE es un elemento clave en el ensamblaje del CR y en replicación viral

Se procesaron células de levadura *Δpah1* que expresaban los elementos necesarios para la replicación de TBSV para inmunomarcaje y estudio de la distribución de nanoclusters de p33-MT. Así, las células se trataron con oro, se incluyeron en resina LR-White y no se introdujeron agentes de tinción y contraste. Sobre secciones ultrafinas recogidas en rejillas Quantifoil®, se realizó doble inmunomarcaje para detectar dsRNA viral y PDI (*protein disulfide isomerase*, marcador específico de RE). En la Figura 42A se puede observar un compartimento esférico y conectado con membranas de RE, definido por las moléculas de p33-MT. Dentro del compartimento se localizaron esférulas o vesículas donde se concentra la señal de dsRNA y también se observaron clusters de p33-MT. Dentro del compartimento también se detectó el marcador de RE; además, las membranas de RE rodean y conectan con el compartimento. Después de realizar el inmunomarcaje se tiñeron algunas secciones para obtener algo de contraste que permitiese distinguir ciertos orgánulos y membranas. Aunque en estas condiciones no se pueden visualizar los clusters de p33-MT, en la Figura 42B se puede apreciar lo mismo que en la Figura 42A; es decir, en la imagen teñida se observa un compartimento delimitado por una membrana en cuyo interior se concentran las señales de PDI y dsRNA. Dicho compartimento está conectado a membranas del RE, además, en la Figura 42C se muestra la detección de dsRNA en RE, que suele ser débil pero resultó intensa en esta zona. Estos resultados demuestran que en levaduras *Δpah1* el CR ensambla en esférulas o vesículas integradas en un compartimento de mayor tamaño que en el *wt*. Se puede apreciar que las Figuras 39, 40 y 42 muestran distintos tipos de vistas del mismo compartimento utilizado por el virus para ensamblar los CRs. La señal de p33-MT-nanoclusters es muy intensa en estas células, lo que demuestra una mayor expresión de la proteína que aparece integrada en gran cantidad de membranas intracelulares y en el RE. La replicasa viral es activa en las esférulas situadas en el interior del compartimento, donde se concentran las señales de p33-MT, dsRNA y PDI. Las membranas de RE están conectadas al compartimento que contiene las esférulas virales y también se ha detectado replicación viral en este orgánulo celular.

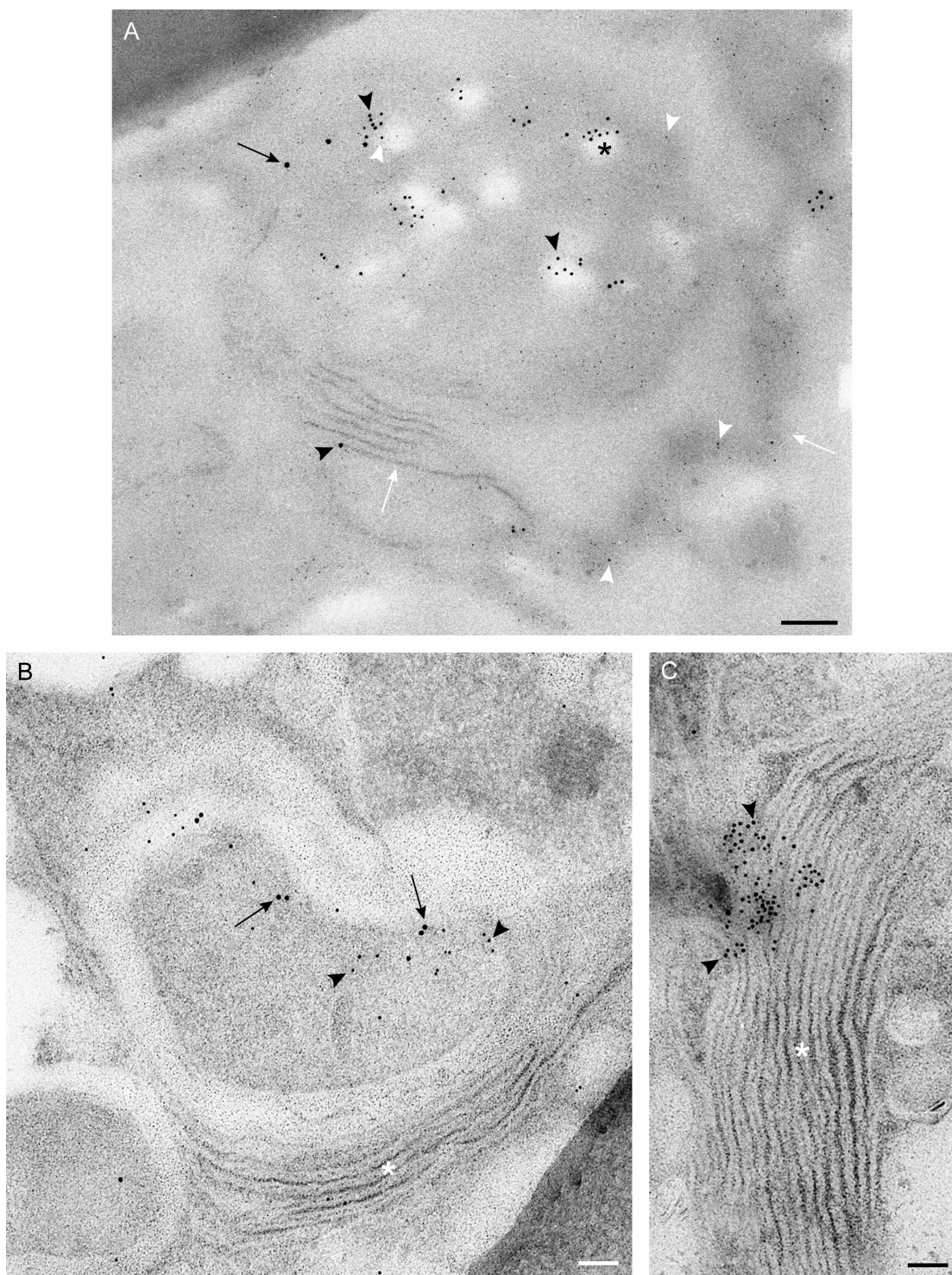


Figura 42. Colocalización de dsRNA y PDI en el CR de levaduras *Apah1*

A) MET de en secciones ultrafinas sin teñir. Membranas de RE (flechas blancas) con nanoclusters de p33-MT (puntas de flecha blancas) rodean y conectan con el CR. El marcador específico de RE (PDI, partículas de oro de 10 nm, flecha negra), se localiza en el interior del compartimento viral y próximo a la señal de dsRNA. En el interior del compartimento, los clusters de p33-MT y la señal de dsRNA (partículas de oro de 5 nm, puntas de flecha negras) colocalizan dentro de las esférulas virales (asterisco negro). B y C) TEM de secciones teñidas muestran por inmunomarcaje la colocalización de las señales de PDI y dsRNA (flechas y puntas de flecha, respectivamente) en el orgánulo de replicación

asociado con membranas del RE (asterisco blanco) en el panel B; y membranas de RE altamente marcadas con la señal de dsRNA en C. Barras: 100 nm.

Una vez confirmada la identidad del compartimento de replicación en las levaduras *Δpah1*, en la Figura 43 se muestra una comparación de la estructura del mismo, tal y como se observa con distintas técnicas de procesamiento de muestras para MET. El orgánulo de replicación en muestras procesadas para análisis de ultraestructura, se muestra en la Figura 43A donde se observa un compartimento conectado con membranas del RE. Las membranas aparecen muy contrastadas por el tetróxido de osmio utilizado durante la inclusión, pero dependiendo del ángulo de corte se visualizan zonas que demuestran que se trata de RE. En la Figura 43B se observa el resultado obtenido si no se introduce tetróxido de osmio y se realiza inmunomarcaje. La replicación viral y el RE se detectaron con anticuerpos específicos dsRNA y PDI, respectivamente. La tinción posterior de las rejillas permitió distinguir un compartimento esférico donde se concentra la señal de dsRNA y que está conectado a membranas del RE (Figura 43B). También se detectó señal de dsRNA y de PDI en RE, como muestra la Figura 43B. El estudio de secciones no teñidas, permitió visualizar las moléculas de p33-MT, las cuales definen un compartimento esférico con clusters en su interior y conectado a membranas de RE (Figura 43C). Mediante procesamientos distintos se está demostrando que las esférulas virales están integradas en un compartimento u orgánulo modificado, donde tiene lugar la replicación viral en la cepa *Δpah1*. Además, el RE parece desempeñar un papel clave en el ensamblaje del CR y en la replicación de TBSV en dichas cepas de levadura. La visualización de moléculas de p33-MT mediante METTEM ha permitido demostrar que la replicasa viral se integra en membranas intracelulares y del RE, definiendo el orgánulo de replicación y mostrando la localización de la replicasa viral por el interior de la célula hasta las esférulas.

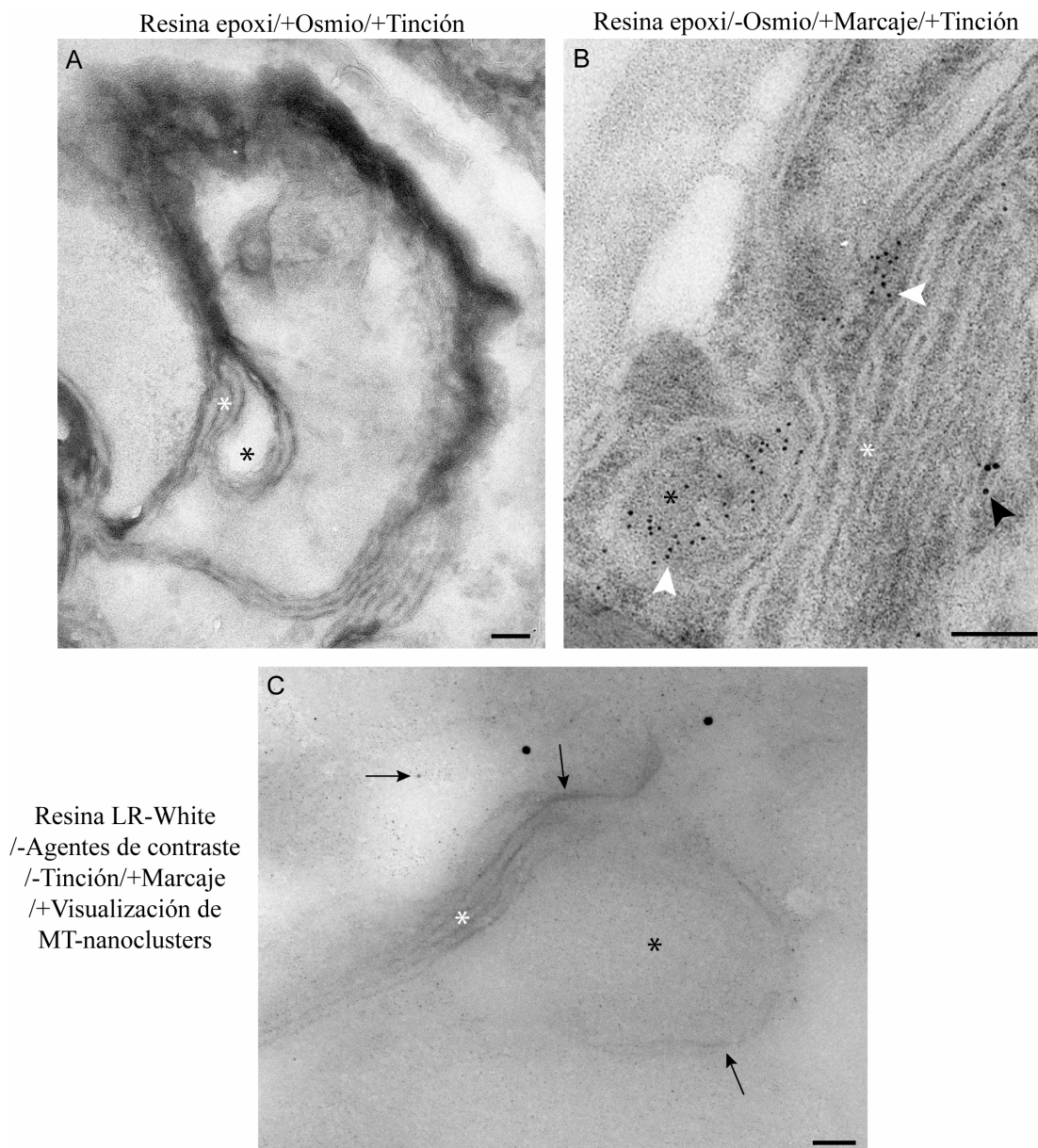


Figura 43. Visualización del orgánulo de replicación en levaduras *Apah1* tras distintos procesamientos para MET

MET de secciones ultrafinas teñidas y sin teñir muestran el orgánulo de replicación (asterisco negro) asociado con membranas de RE (asterisco blanco). A) Ultraestructura de la prolongación de membranas del RE que conectan con el compartimento viral. B) Detección mediante inmunomarcaje de dsRNA (partículas de oro de 5 nm, puntas de flecha blancas), en el RE y en el orgánulo de replicación. Además, la señal de PDI (partículas de oro de 10 nm, puntas de flecha negras) se concentra en el RE. C) Secciones sin teñir muestran mediante MET, membranas de RE definidas por los clusters de p33-MT (flechas) asociadas con el compartimento viral, también delimitado por las moléculas de replicasa viral y con clusters de p33-MT en su interior. Barras: 100 nm.

1.5.5. Modelo 3D de la organización de las moléculas de replicasa viral

Con la técnica METTEM se demostró que las moléculas de replicasa viral p33-MT se localizan en las esférulas virales, pero también se distribuyen en membranas intracelulares y en orgánulos como el RE. La detección de replicación viral mediante inmunomarcaje permitió conocer en qué localizaciones la replicasa viral es más activa. Aunque la proteína se encuentre en membranas intracelulares definiendo un compartimento, parece que sólo es activa en las esférulas virales y también en membranas del RE. En estas localizaciones, la replicasa viral tendría la organización y factores necesarios para la replicación viral. Se realizó un estudio de tomografía electrónica para determinar si la organización de las moléculas de p33-MT variaba en función del estado de la proteína (activa o inactiva). Con reconstrucciones 3D y alta resolución se puede determinar la organización y el grado de empaquetamiento de las moléculas de p33-MT.

Se recogieron secciones gruesas (~400 nm) de levaduras *Δpahl*, que expresaban los elementos necesarios para la replicación viral, tratadas con oro e incluidas en resina LR-White. Se utilizaron rejillas Quantifoil® de cobre para recoger las secciones, las cuales no se tiñeron para poder visualizar los clusters de p33-MT. Se obtuvieron 5 tomogramas de 5 células de levadura con gran cantidad de señal p33-MT-oro y se analizaron con el programa IMOD. La reconstrucción 3D y visualización de los nanoclusters se realizó con Amira®. En las Figuras 44 y 45 se muestra la organización de las moléculas de p33-MT en distintas células de levadura. Las moléculas de p33-MT se distribuyen definiendo membranas mostradas con distintos modos de visualización del programa Amira® (Figuras 44A y C). Los clusters presentan alrededor de 1 nm de diámetro, pero presentan varios patrones de organización, apareciendo clusters individuales de mayor tamaño y otros más pequeños formando grupos, con un mayor grado de empaquetamiento. Dichos agregados presentan formas esféricas y frecuentemente están asociados a membranas, siendo compatibles con las esférulas virales. La imagen 44B muestra uno de los planos del tomograma 44A, no se observan todos los clusters del 3D debido a que la reconstrucción es la suma de todos los planos. Por lo tanto, en la imagen 44B se muestra sólo la información de un plano, aunque se puede apreciar una gran acumulación de moléculas de p33-MT, que también se encuentra en el modelo 3D (Figura 44A). En la Figura 44D las membranas se visualizaron de una forma que permitía observar los clusters de p33-MT en su interior. Así, se puede apreciar como el grado de empaquetamiento de las moléculas de p33-MT es mayor en las membranas, coincidiendo generalmente con zonas de curvatura de la membrana. En el interior del compartimento se observaron clusters de mayor tamaño y, aparentemente, no asociados con membranas densas. Es importante destacar que las membranas están definidas por los clusters de MT, realmente, no estamos viendo membranas contrastadas con un agente de tinción; por lo que no se puede asegurar que los clusters de las zonas internas no están asociados con membranas, las cuales podrían no apreciarse por haber sido seccionadas en su interior (siguiendo el plano principal de la bicapa lipídica). Los clusters de mayor tamaño podrían

ser consecuencia de la proximidad de dos o más moléculas de MT. En la Figura 44E se muestran los clusters de p33-MT en membranas o en el interior del compartimento, en uno de los planos del tomograma. Se puede observar que las moléculas de p33-MT se organizan de manera distinta, disponiéndose en las membranas con un mayor grado de empaquetamiento. Además, se detectaron zonas próximas a membranas con grandes agregados de moléculas de replicasa viral (Figuras 44A y C).

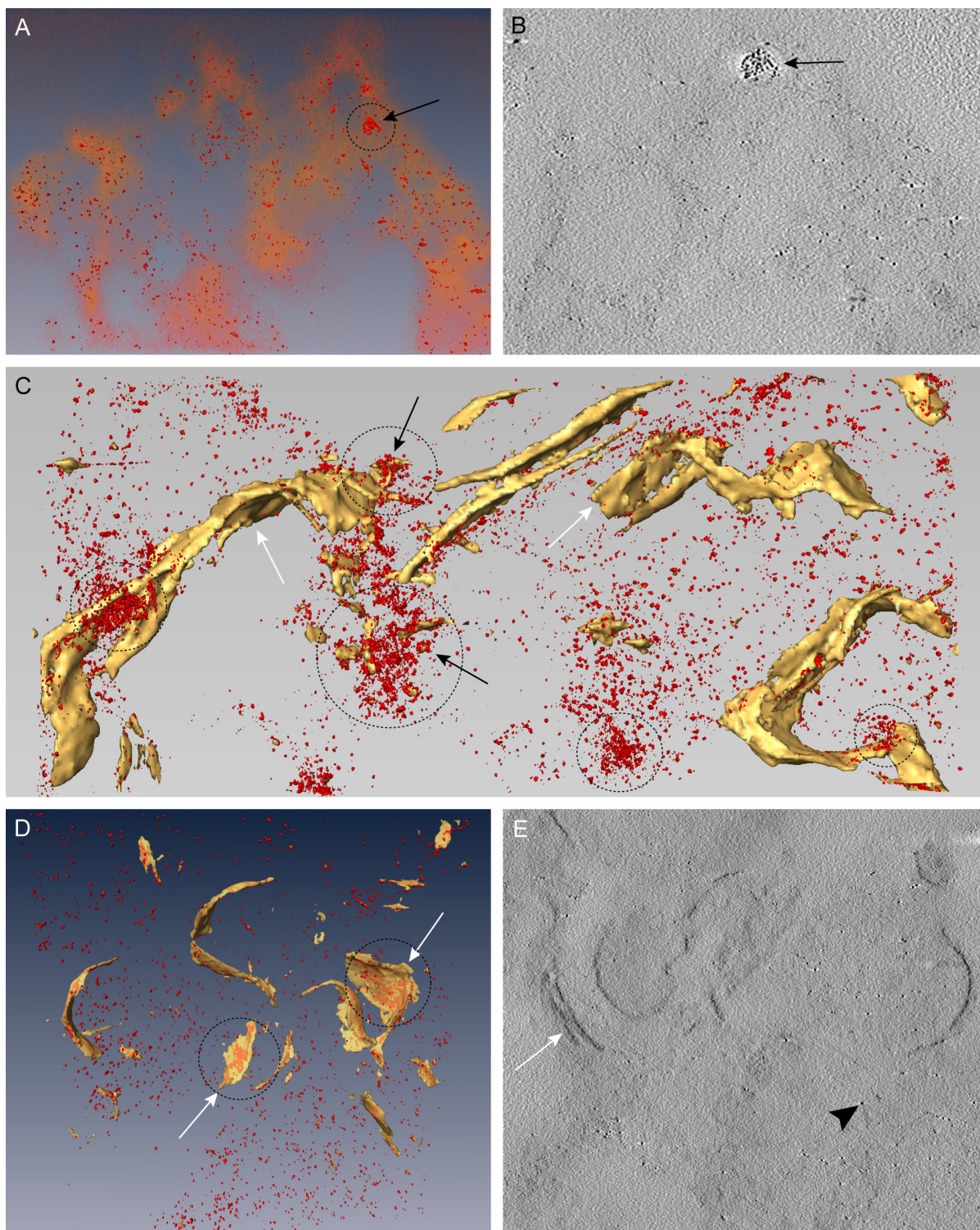


Figura 44. Tomografía electrónica y reconstrucción 3D de los clusters de p33-MT

Estudio por tomografía electrónica de secciones de 400 nm sin teñir de células de levadura *Apah1* tratadas con HAuCl_4 , y que expresan las proteínas y elementos necesarios para la replicación viral. A, C y D) Modelo 3D de la distribución de moléculas de p33-MT. Los clusters de p33-MT, de aproximadamente 1 nm de diámetro, se segmentaron en rojo. Las flechas negras y los círculos discontinuos marcan grandes agregados de clusters de p33-MT en A y C. Las membranas, definidas por las moléculas de p33-MT, se muestran con distintos modos de visualización del programa Amira®

(naranja en A, amarillo en C y amarillo-"transparente" en D, flechas blancas en C y D). B y E) Dos secciones digitales de los tomogramas originales de A y D, respectivamente, en las que se observan los clusters de p33-MT. La flecha negra en B señala una acumulación o agregación de clusters de p33-MT. E) Se observaron clusters individuales de p33-MT de mayor tamaño (punta de flecha), mientras que las flechas blancas apuntan a membranas definidas por las moléculas de replicasa viral.

Si se visualizan las membranas en modo "transparente" con Amira®, se pueden apreciar algunos detalles de la distribución de las moléculas de replicasa viral. Así, en la Figura 45A se observa otra célula de levadura donde la organización de las moléculas de p33-MT es diferente según su localización. El grado de empaquetamiento es mayor en las membranas, indicando que las moléculas están muy próximas entre sí. En las Figuras 45B y D se muestran las moléculas de p33-MT en uno de los planos de los tomogramas correspondientes a 45A y C, respectivamente. En la imagen 45C se observa la distribución de moléculas de p33-MT en membranas del RE. En el RE no se observaron los agregados con forma esférica y densamente empaquetados, lo cual coincidiría con la menor actividad de p33 en las membranas del RE. En el interior del compartimento se muestran clusters de mayor tamaño y dispersos, no asociados aparentemente con membranas densas. Datos anteriores demuestran que la replicación viral tiene lugar en el interior de un compartimento asociado a RE y también en las membranas del retículo. Por lo tanto, los resultados de tomografía electrónica y reconstrucción 3D parecen indicar que las moléculas de p33-MT presentan una organización y grado de empaquetamiento distinto según su localización. Se observaron acumulaciones de moléculas de p33-MT con alto grado de empaquetamiento en la cara interna de membranas curvadas, compatible con el interior del compartimento mostrado en las Figuras 39, 40 y 42A. El modelo 3D coincide con los resultados obtenidos anteriormente, en los cuales, las moléculas de p33 se insertan en membranas definiendo un compartimento donde se integran las esférulas virales, y que está conectado con el RE. En la Figura 45A se muestran zonas en las que se concentran las moléculas de p33-MT, y que coinciden con la región de curvatura de la membrana, compatibles con las esférulas virales. Además, por resultados anteriores descritos en la bibliografía y en esta tesis doctoral, se sabe que es en las esférulas donde el virus replica activamente. Por lo tanto, se podría correlacionar el estado de activación de p33 con un mayor grado de empaquetamiento de las moléculas, presente hacia el interior de las zonas de curvatura de las membranas (esférulas). Junto a éstas, se pudieron apreciar regiones en las que las moléculas de p33-MT presentan un menor nivel de agregación. El distinto grado de empaquetamiento de las moléculas de replicasa viral podría estar relacionado con el estado de actividad de la proteína, ya que como se demostró en apartados anteriores, la replicasa p33 no estaría igualmente activa en todas las localizaciones. Los datos apuntan a que las regiones con un mayor grado de empaquetamiento de las moléculas de p33-MT se corresponden con las zonas donde la proteína está activa y se está llevando a cabo la replicación viral (esférulas virales y membranas del RE).

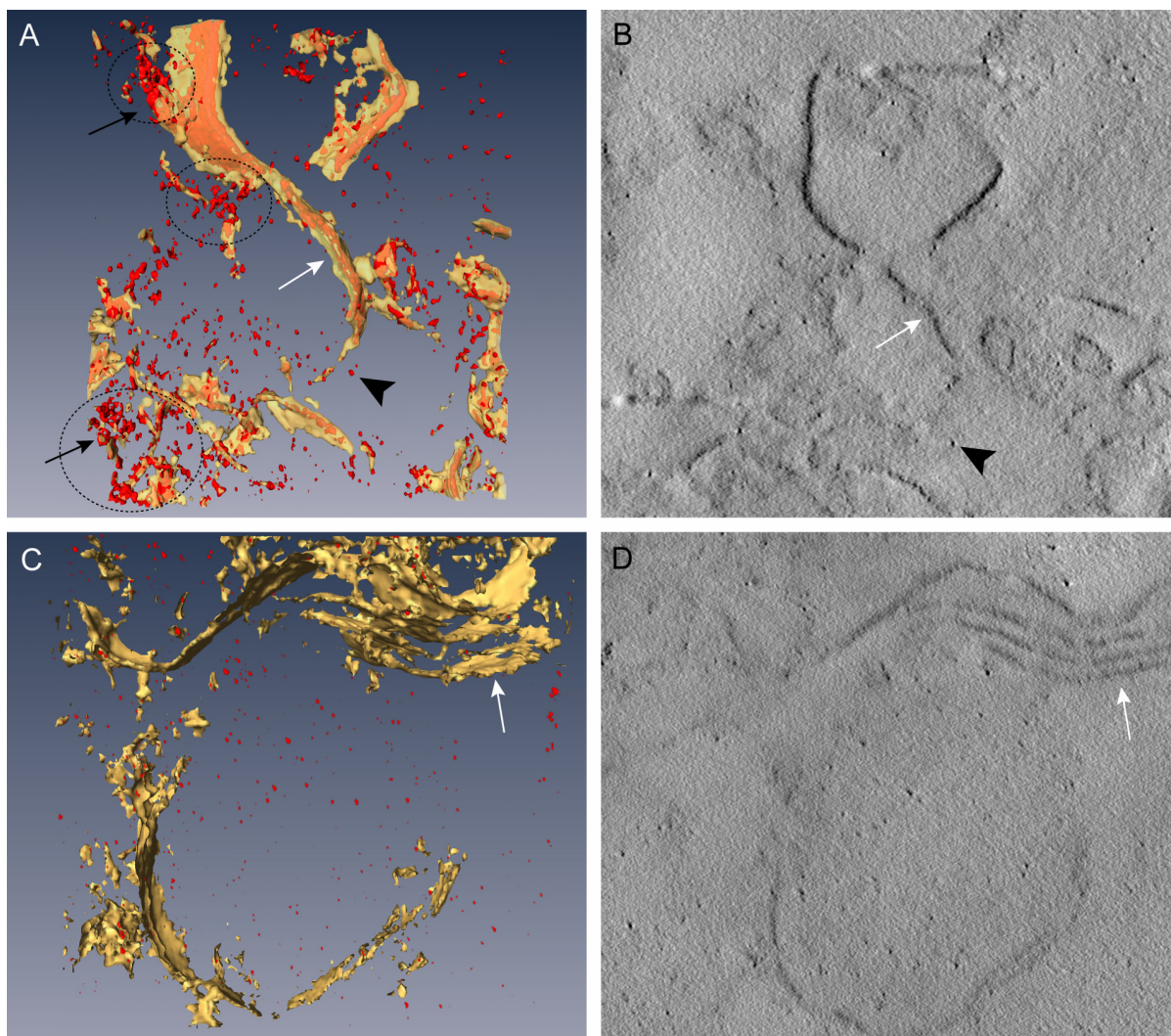


Figura 45. Visualización de las moléculas de replicasa viral p33-MT por tomografía electrónica y reconstrucción 3D

Estudio de tomografía electrónica de secciones de 400 nm sin teñir de células de levadura *Apah1* que expresan las proteínas y elementos necesarios para la replicación viral y tratadas con HAuCl_4 . A y B) Modelo 3D (A) y sección digital del tomograma original (B) en los que se puede apreciar la organización de los clusters de p33-MT en membranas (flechas blancas) (membranas, amarillo "transparente" en A). Se observaron agregados de clusters próximos a las membranas del compartimento (rojo en A, flechas negras y círculos discontinuos). Los clusters de mayor tamaño se muestran en A y B marcados por una punta de flecha. C y D) Reconstrucción 3D (C) y sección digital del tomograma original (D) en los que se pueden observar membranas de RE (amarillo en C, flechas blancas) definidas por las moléculas de p33-MT. Se observa un compartimento asociado al RE con nanoclusters de p33-MT en su interior.

1.6. Actina y replicación de tomosvirus en plantas y levaduras

1.6.1. La eliminación de actina provoca un incremento en la replicación de TBSV

Se testaron distintos protocolos para la introducción de tomosvirus en la planta *Nicotiana Benthamiana*. Se utilizó el sistema de *Agrobacterium Tumefaciens* ADN-T para la expresión de los

elementos necesarios para la replicación del tombusvirus CNV. También se empleó la técnica de *SAP-inoculation* de TBSV a través de las hojas para la infección de la planta. Posteriormente, se introducía citocalasina-D (inhibidor de la polimerización de los filamentos de actina) mediante infiltración. Se probaron distintos tiempos y al final se observó un efecto sobre la replicación viral utilizando el sistema de *SAP-inoculation* de TBSV. En la Figura 46A se muestra el resultado tras extracción de ARN total de plantas tratadas con citocalasina-D y plantas control (no tratadas con la droga). La cantidad de ARN viral es mayor en las plantas con citocalasina-D si se compara con la cantidad de ARN celular de la planta. Se puede observar el efecto de la infección viral tras 1 o 4 días de la *SAP-inoculation* de TBSV (Figuras 46B y C). A los 4 días las hojas presentan abrasiones y lesiones. Por lo tanto, se estableció un sistema efectivo para obtener infección productiva de tombusvirus en *Nicotiana Benthamiana*, detectando replicación viral y permitiendo testar drogas como la citocalasina-D. Además, estos resultados demuestran que la inhibición de actina con citocalasina-D provoca un incremento de la replicación viral de TBSV en plantas, detectado por una mayor acumulación de ARN viral.

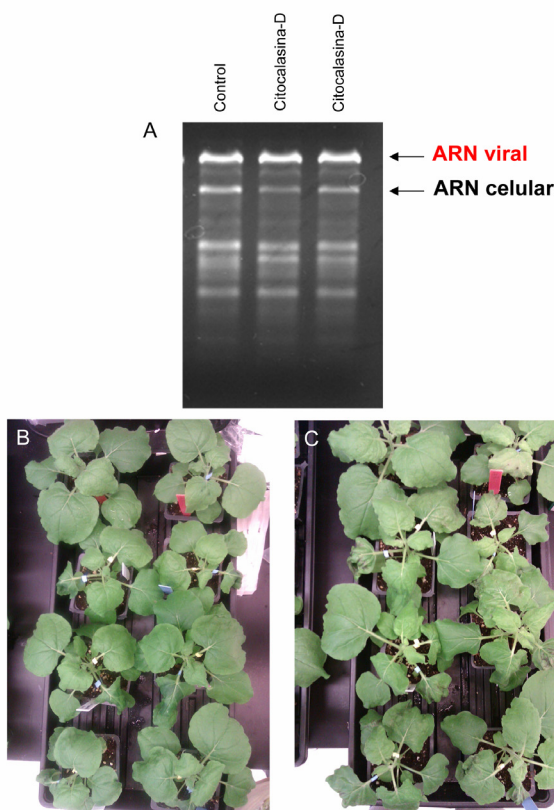


Figura 46. Replicación de tombusvirus en plantas

Se infectaron hojas de *Nicotiana Benthamiana* con TBSV introducido por *SAP-inoculation* y se trataron con citocalasina-D para inhibir actina. A) Incremento de la cantidad de ARN viral en plantas tratadas con citocalasina-D. B y C) Imagen de plantas infectadas por TBSV, al día siguiente y a los cuatro días de la *SAP-inoculation*, respectivamente. Se observan lesiones y abrasiones en las hojas, sobre todo en el panel C.

1.6.2. Esférulas de TBSV en *Nicotiana Benthiana* tratadas con citocalasina-D

El estudio del CR de tombusvirus mediante MET en plantas es difícil, ya que son células muy grandes y no hay muchas células con esférulas virales. Por ello, es necesario analizar gran número de células para poder observar el CR. El tratamiento con citocalasina-D al producir un incremento en replicación de TBSV, podría facilitar el estudio de las esférulas virales. Así, se procesaron hojas de *Nicotiana Benthiana* infectadas con TBSV mediante *SAP-inoculation* y tratadas con citocalasina-D, para su estudio mediante MET. En la Figura 47A se puede observar que en estas condiciones se produce gran cantidad de virus, los cuales, aparecen con frecuencia en empalizada o formando pseudo-cristales. En células infectadas por el virus pero no tratadas con citocalasina-D, también se producen virus pero no se observaron estas grandes acumulaciones de partículas virales en las mismas condiciones. Se visualizaron esférulas virales con mayor frecuencia (58%) que en células infectadas no tratadas con la droga (35%), aunque no existen diferencias entre la morfología y el tamaño de las esférulas en estas dos condiciones. El orgánulo de replicación formado en plantas tratadas con la droga tampoco presentó diferencias con el descrito, por otros autores, en plantas no tratadas con dicha droga (Barajas *et al.*, 2009). En las Figuras 47B, C y D se muestran esférulas de unos 50 nm de diámetro, formadas en células de planta tratadas con citocalasina-D. El CR está integrado en un compartimento u orgánulo modificado y, en ocasiones, las esférulas estaban conectadas a la membrana del compartimento. Por lo tanto, el tratamiento con citocalasina-D aumenta la frecuencia de esférulas virales y la producción de virus en *Nicotiana Benthiana*, facilitando los estudios de MET. Además, la droga no parece inducir cambios en la morfología ni en el tamaño de las esférulas formadas por TBSV.

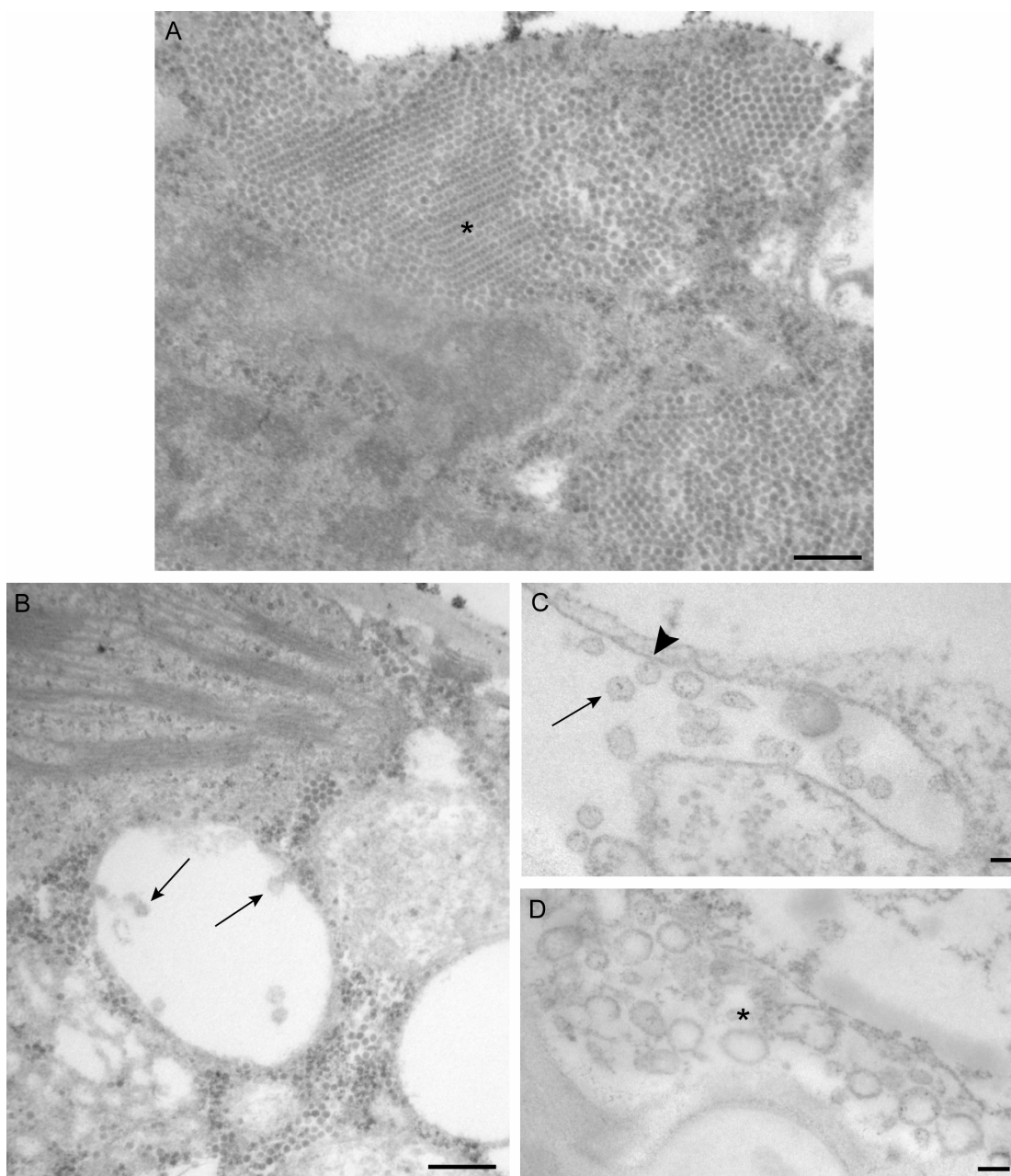


Figura 47. Formación de esférulas de Tombusvirus en *Nicotiana Benthamiana* y acumulación de virus

MET de células de planta infectadas por TBSV por *SAP-inoculation* y tratadas con citocalasina-D. Secciones ultrafinas de hojas procesadas para inclusión en resina epoxi-araldita. Las secciones fueron teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo. A) Acumulación de partículas virales (~24 nm de diámetro) en células de *Nicotiana Benthamiana*. Se encontraron zonas con virus en empalizada o formando pseudo-cristales (asterisco). B) Compartimento o vacuola que contiene esférulas virales (flechas) en su interior. C y D) Detalle de las esférulas (flecha) formadas por TBSV en plantas; poseen un diámetro de ~50 nm y en ocasiones se observaron unidas a membranas (punta de flecha negra). Concentración de esférulas virales en un compartimento delimitado por membranas que podrían corresponder con RE o con peroxisoma (asterisco). Barras: 200 nm en A y B; 50 nm en C y D.

1.6.3. Acumulación de membranas en levaduras tratadas con citocalasina-D

En el laboratorio del Dr. Peter Nagy habían demostrado que en células de levadura la inhibición de actina con citocalasina-D provocaba el mismo efecto que en plantas; es decir, incremento de la replicación de tombusvirus. En levaduras el porcentaje de células, en secciones al azar, que presentaban esférulas virales era muy bajo (alrededor de un 10%). Por lo tanto, se pensó que el tratamiento con citocalasina-D podría incrementar la replicación viral y el número de esférulas; facilitando así su análisis por MET. Por ello, se trataron células de levadura que expresaban las proteínas y el ARN viral necesarios para la replicación de TBSV con citocalasina-D. Posteriormente, se incluyeron en resina LR-White sin introducir agentes de contraste para poder realizar detección de dsRNA y PDI mediante inmunomarcaje. Se recogieron secciones ultrafinas en rejillas de oro y se tiñeron, tras la incubación con anticuerpos, con acetato de uranilo y citrato de plomo. En las Figuras 48A, C y D, se muestra el orgánulo de replicación con esférulas o vesículas que constituyen el CR del virus. Dentro del compartimento se concentran las señales de dsRNA y PDI. Además, en las Figuras 48C y D se observan membranas de RE en el interior del compartimento. Estas membranas no se observaron de forma tan característica en células no tratadas con la droga, pero son muy semejantes a las que forman parte del compartimento en la cepa *Δpah1* (Figura 41). Por otro lado, el porcentaje de células de levadura con esférulas virales no se incrementó de forma significativa, en secciones al azar, con respecto a las células no tratadas con la droga. Sin embargo, sí se observaron cúmulos de membrana característicos no presentes en células no tratadas con citocalasina-D (Figura 48B). Estas estructuras formadas por membranas apiladas mostraron un marcaje significativo con anticuerpos anti-dsRNA y anti-PDI. Los resultados del tratamiento con citocalasina-D en células de levadura demuestran que el compartimento y las esférulas de TBSV son semejantes a los obtenidos sin la droga, aunque la eliminación de actina podría estar relacionada con aparición de acúmulos de membrana utilizados por el virus para replicarse de forma más efectiva. Se observaron fragmentos de membrana de RE en el interior del compartimento, asociados con las esférulas virales, lo que podría implicar que en ausencia de actina el RE juega un papel más importante en la formación del CR y en replicación viral.

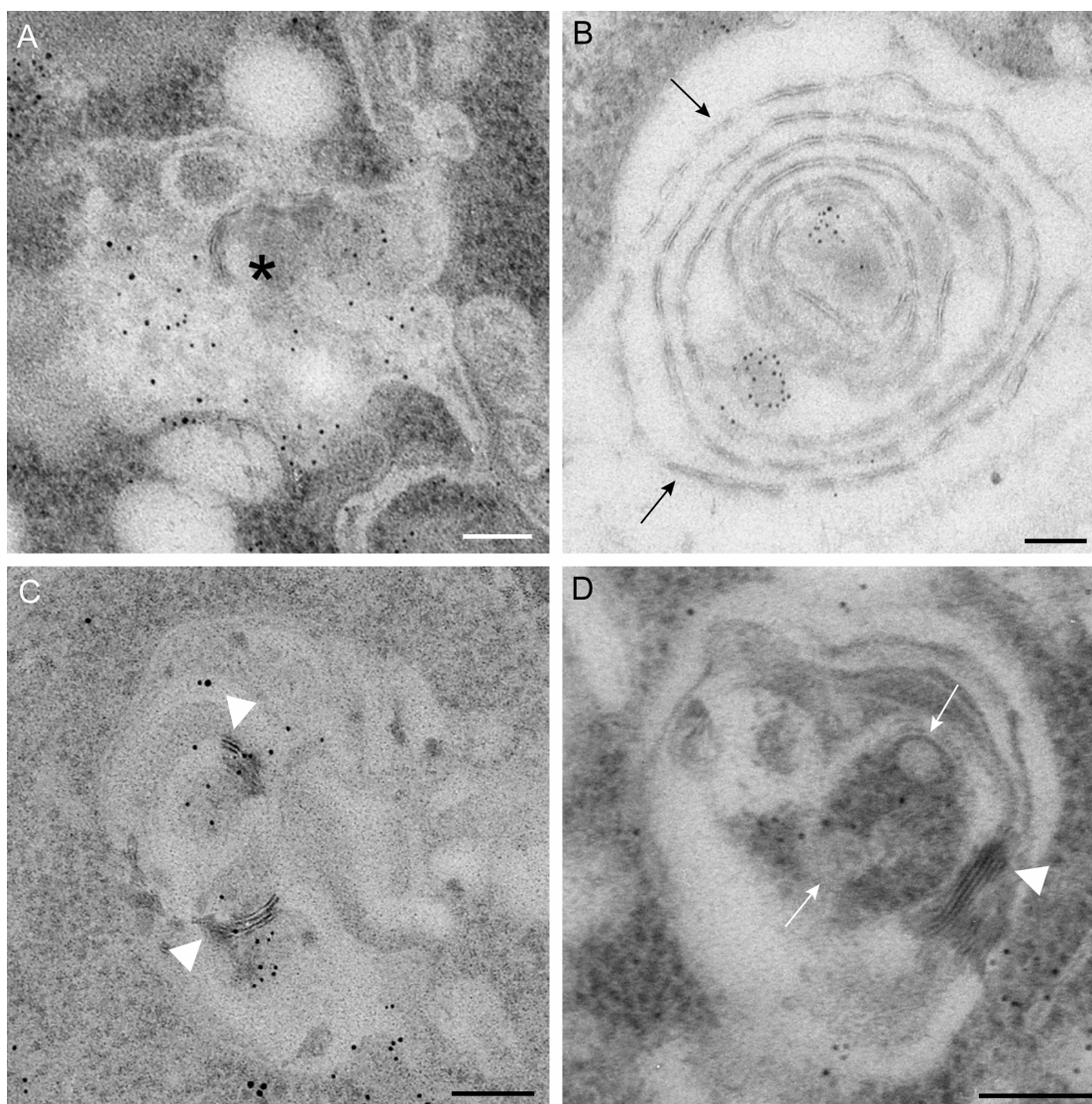


Figura 48. Esférulas de TBSV en levaduras tratadas con citocalasina-D

Se trataron con citocalasina-D células de levadura que expresaban los elementos necesarios para la replicación de tombusvirus, para inhibir la polimerización de filamentos de actina. Se procesaron para MET y se recogieron secciones ultrafinas para detectar dsRNA (partículas de oro de 5 nm) y PDI (partículas de oro de 10 nm), marcador de RE, mediante inmunomarcaje. Las secciones se tiñeron para obtener contraste y distinguir membranas y compartimentos. A) Orgánulo de replicación de TBSV (asterisco) con esférulas y marcaje de dsRNA y PDI en su interior. B) Acumulación de membranas en la periferia celular (flechas) marcadas con anti-dsRNA y anti-PDI (flechas). C y D) Compartimento u orgánulo modificado con esférulas en su interior (flechas blancas) y membranas de RE (puntas de flecha blancas). Se detectó marcaje de dsRNA y PDI en el interior del compartimento. Barras: 100 nm.

2. Virus Bunyamwera

2.1. Estudio de la factoría viral en células Vero

Estudios previos en células BHK-21 mostraron que el VBUN ensambla una factoría alrededor del aparato de Golgi en región perinuclear. Además, el citoesqueleto de actina se altera durante la infección por VBUN. Concretamente, se observó que los filamentos de actina no desaparecen pero se concentran en la periferia celular (Fontana *et al.*, 2008). La combinación de microscopía óptica y electrónica fue muy importante para determinar los elementos clave que forman la factoría. Es interesante estudiar la factoría del VBUN en células Vero porque resultados previos en el laboratorio mostraron que durante la infección por VBUN se produce fragmentación dramática del aparato de Golgi (Salanueva *et al.*, 2003). Dicha fragmentación está relacionada con un efecto citopático severo y podría implicar la formación de factorías distintas a las caracterizadas previamente en células BHK-21. Por ello, se infectaron células Vero a 1 UFP/célula durante 4 y 6 horas para visualizar, con marcadores de fluorescencia, el efecto de la infección sobre el citoesqueleto y distintos orgánulos celulares. Se escogieron estos tiempos post infección porque a las 4 horas hay pocas células infectadas y con poca proteína viral, lo que permite estudiar el estado de la célula en una etapa temprana de la infección. A las 6 hpi hay mayor acumulación de proteína viral y también más células infectadas, correspondiente con una etapa más avanzada de la infección y que puede aportar información distinta y complementaria. Así, se puede observar en las Figuras 49A, B y C cómo la infección por VBUN afecta al citoesqueleto de actina provocando una desaparición total de las fibras de estrés. Se utilizó un anticuerpo primario que reconoce la glicoproteína viral Gc para identificar las células infectadas y para estudiar la dinámica de la infección. Como marcador del citoesqueleto de actina se utilizó la faloidina conjugada con una sonda fluorescente. En la imagen 49A se muestra la distribución de los filamentos de actina en células control (no infectadas). Sin embargo, a las 4 hpi se observa como las células infectadas han perdido la mayor parte de los filamentos de actina, encontrándose algo de señal sólo en la periferia celular, delimitando el contorno de la célula. A las 6 hpi hay mayor acumulación de proteína viral Gc y no se observaron filamentos de actina en las células Vero infectadas. Estos resultados demuestran que la infección por VBUN afecta específicamente al citoesqueleto de actina de células Vero. Por otro lado, se estudió la implicación de distintos compartimentos membranosos en la infección viral. El aparato de Golgi se estudió utilizando anti-gigantina como marcador; la gigantina es una glicoproteína estructural de la membrana de la región *cis-media* del Golgi. En la Figura 49D se observa cómo el aparato de Golgi en células control se localiza en posición yuxtannuclear. En células infectadas (4 hpi, 49E) la proteína viral Gc se acumula en el aparato de Golgi que mantiene su localización junto al núcleo (señal amarilla por la superposición de las señales verde y roja). A las 6 hpi (49F) se puede apreciar la fragmentación del aparato de Golgi en células infectadas y la señal de gigantina se dispersó por el citosol, con un patrón

totalmente distinto al que mostraron las células control (49D). En el caso del RE, se utilizó un anticuerpo que reconoce PDI, enzima específica de dicho compartimento. En la Figura 49G se muestra la distribución de la señal de PDI en células no infectadas, que presenta un patrón reticular característico del RE. En células infectadas se observa un reclutamiento del RE al lugar de la factoría viral; parece que el marcador del RE se concentra en zonas concretas de la célula, donde se acumula la proteína viral a las 4 y 6 hpi (Figuras 49H e I). Estos resultados demuestran que la infección por VBUN genera importantes cambios en la distribución y organización de endomembranas en células Vero. Se produce una completa desorganización del citoesqueleto de actina, fragmentación del aparato de Golgi y reclutamiento del RE a la factoría viral. A pesar de estos cambios dramáticos, las factorías virales ensambladas en Vero son funcionales dando lugar a títulos virales similares a los producidos en células BHK-21 (Salanueva *et al.*, 2003). Los microtúbulos no se alteran ni en Vero (Salanueva *et al.*, 2003) ni en BHK-21 (Novoa, resultados no publicados), por lo que, parece ser que la actina es el componente del citoesqueleto alterado selectivamente por el virus en ambos tipos celulares, aunque con un efecto más severo en células Vero.

Para estudiar el CR mediante MET se infectaron células Vero con VBUN a 1UFP/célula durante 10 horas y se procesaron para el estudio de la ultraestructura. El VBUN ensambla el CR en el aparato de Golgi, generando importantes cambios en su morfología. Así, en la Figura 49J se muestra un Golgi de una célula control no infectada, en la cual, las cisternas presentaron una morfología normal. La infección por VBUN en células Vero provoca la fragmentación del aparato de Golgi, como se ha visto por fluorescencia, pero los fragmentos de Golgi siguen siendo funcionales y pueden ser utilizados para ensamblaje y replicación viral (Salanueva *et al.*, 2003). Se observó que en las cisternas del Golgi se forman los tubos virales (Figura 49L), que presentan una esférula o dominio globular de mayor diámetro. Estas estructuras son idénticas a las que se encontraron en células BHK-21 y en las que se localizan las polimerasas activas, concretamente, en el dominio globular (Fontana *et al.*, 2008). En la Figura 49K se observa una esférula viral junto a dos virus intracelulares inmaduros, así como virus intracelulares maduros. Los virus intracelulares se diferenciaron por su densidad electrónica, siendo superior en los virus maduros. Estos resultados indican que el aparato de Golgi es el elemento central de la factoría y el sitio de ensamblaje del CR de VBUN, en células Vero en las que sigue siendo funcional, a pesar de su fragmentación.

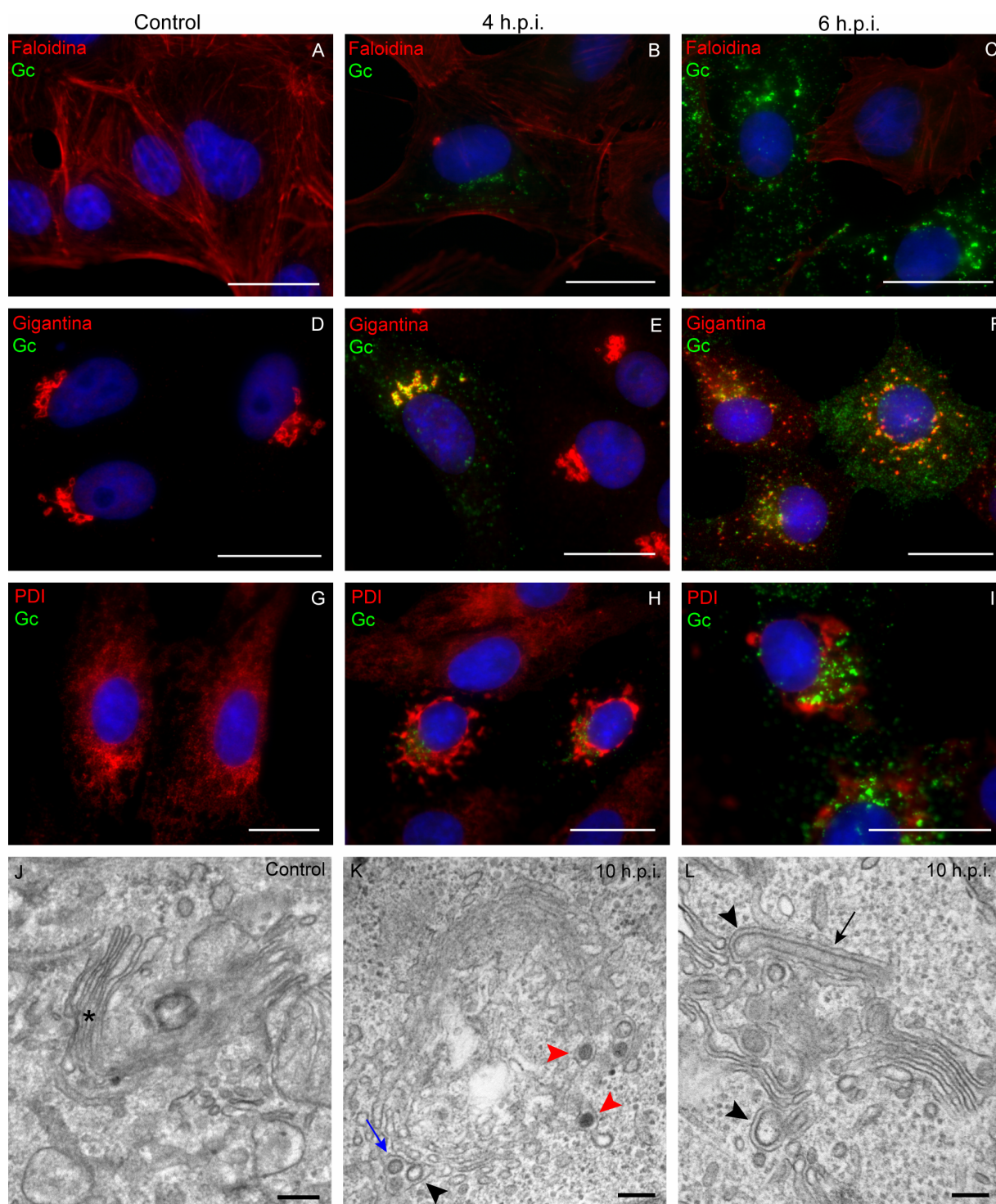


Figura 49. Órganulos celulares implicados en la formación de la factoría viral en células Vero

A-I) Se infectaron células Vero con VBUN durante 4 y 6 horas para el estudio de los componentes de la factoría viral por microscopía óptica. Se utilizó faloidina conjugada con una sonda fluorescente para marcar los filamentos de actina (rojo) y DAPI para teñir los núcleos (azul). La identificación de células infectadas se realizó utilizando un anticuerpo que reconoce la proteína viral Gc (verde). Órganulos celulares como el aparato de Golgi y el RE se marcaron utilizando anticuerpos frente a proteínas específicas de dichos orgánulos: gigantina (rojo) y PDI (rojo), respectivamente. A, D y G) Células control, no infectadas. B, E y H) Células infectadas a 1UFP/célula y 4 hpi. C, F e I) Células infectadas a 1UFP/célula

y 6 hpi. J-L) Células Vero control e infectadas con VBUN a 1UFP/célula y 10 hpi, incluidas en resina epoxi y estudiadas por MET. J) Aparato de Golgi (asterisco) en una célula control. K y L) Células infectadas con aparatos de Golgi en los que se observan tubos virales que presentan un dominio globular o esférula (puntas de flecha negra) y una estructura cilíndrica (flecha negra), virus intracelulares inmaduros (flecha azul) y virus intracelulares maduros (puntas de flecha rojas). Barras: 25 μ m en A-I; 200 nm en J-L.

Para realizar un estudio completo de la factoría de VBUN en células Vero por MET, visualizar cómo se relacionan sus componentes, y estudiar si son diferentes respecto a las que el virus ensambla en células BHK-21, se estudió su estructura tridimensional. Se obtuvieron secciones seriadas de células infectadas a 1UFP/célula a 10 hpi. Los cortes de 50 nm se recogieron en rejillas de ojal con plástico formvar al 0,5%. Como se ha mencionado en apartados anteriores, las secciones seriadas y la reconstrucción 3D permiten obtener mayor información sobre estructuras celulares de gran tamaño. Además, es una técnica útil para detectar contactos poco frecuentes, sólo visibles en unos pocos planos. En la Figura 50A se observa la factoría viral en células Vero, caracterizada por el reclutamiento de mitocondrias y de RE alrededor del Golgi (amarillo), donde ensambla el CR de VBUN (tubos virales con esférulas). Existen contactos entre el CR (blanco) y los orgánulos celulares, como mitocondrias (rojo) y RE (marrón). También, se pueden apreciar virus inmaduros (azul) muy próximos al Golgi y al RE. Detalles de la asociación que existe entre los virus inmaduros y el CR con membranas de RE se pueden apreciar en la Figura 50B. Estos contactos muestran los sitios de la factoría en los que los genomas virales deben ser transportados desde el CR al sitio de ensamblaje. Los resultados demuestran que aunque el CR de VBUN ensamble en el aparato de Golgi, existen más orgánulos celulares implicados en replicación y morfogénesis viral y que son reclutados a la factoría viral. Además, se establecen contactos entre los CRs virales y ciertos orgánulos celulares, como mitocondrias y RE, de los que probablemente, se recluten factores celulares utilizados por el virus. Las reconstrucciones 3D muestran que a pesar de la fragmentación del Golgi, la estructura básica de la factoría en células Vero es similar a la caracterizada en células BHK-21. Sin embargo, los contactos entre virus inmaduros y membranas del RE no se observaron en células BHK-21 ni en otros tipos celulares infectados por el VBUN.

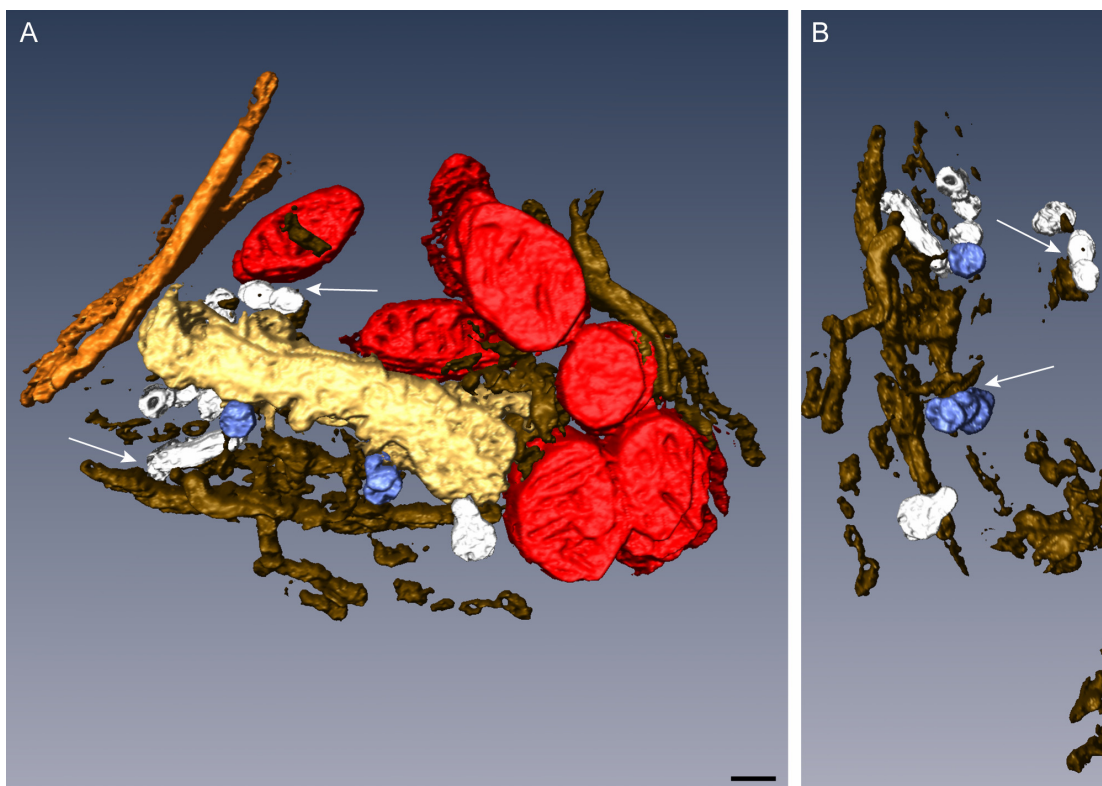


Figura 50. Modelo 3D de la factoría de VBUN en células Vero

Se infectaron células Vero a 1UFP/célula durante 10 horas y se incluyeron en resina epoxi. Se obtuvieron secciones seriadas (~ 50 nm) y se recogieron en rejillas de ojal con formvar al 0,5%. Los cortes se tiñeron con acetato de uranilo saturado y citrato de plomo. A) Reconstrucción 3D de una factoría viral. Los tubos virales con esférulas están representados en blanco, los virus inmaduros en azul, el RE en marrón, el Golgi en amarillo, las mitocondrias en rojo y la membrana nuclear en naranja. B) Detalle de los contactos que existen entre el CR de VBUN y los virus inmaduros con RE, en un modelo 3D en el que se han eliminado las señales correspondientes al resto de los elementos de la factoría, para una mejor visualización. Barras: 100 nm.

2.2. Estudio ultraestructural del CR de VBUN con la técnica METTEM

Se transfectaron células BSR-T7/5 (BHK-21 que expresan de forma constitutiva la polimerasa del bacteriófago T7) con plásmidos que codificaban la nucleoproteína N y la polimerasa viral L fusionada con el marcador MT (L-MT). En el laboratorio del Dr. Richard Elliott habían demostrado previamente, que estas dos proteínas eran suficientes para que tenga lugar la replicación viral. El objetivo era estudiar el CR de VBUN con el método METTEM, para observar cómo se organizan las moléculas de L-MT en el interior de las esférulas de los tubos virales. También se estudió la distribución intracelular de la polimerasa viral con la resolución molecular que da la técnica METTEM y los cambios en su organización cuando se incorpora en los CRs activos.

Para comprobar que el CR se ensamblaba correctamente, se realizó un experimento para detectar replicación viral y proteínas virales por microscopía óptica. Se transfectaron con lipofectamina® células

BSR-T7/5 con plásmidos que expresaban las proteínas virales (L-MT y N). A las 48 hpt se trataron las células con actinomicina-D para inhibir la acción de la ARN polimerasa celular. Posteriormente, se incubaron con bromo uridina para poder detectar la replicación viral por captación de análogos de nucleótido. El resultado de este ensayo se muestra en la Figura 51A, donde una célula transfectada presenta replicación activa de VBUN que se concentra en la zona perinuclear, probablemente coincidiendo con el Golgi, mientras que no existe señal en las células que no están transfectadas. Para detectar la nucleoproteína N se usó un anticuerpo primario específico, obteniéndose señal en las células transfectadas (Figura 51B). La señal de N es citoplásmica y mostró el mismo patrón que en células infectadas y no transfectadas. No se pudieron realizar estudios de colocalización con N en microscopía de fluorescencia debido a la falta de buenos anticuerpos específicos de L y MT. Se realizó un *western blot* de células transfectadas y no transfectadas para detectar las proteínas virales. En la Figura 51C se puede observar cómo las células transfectadas expresan L-MT y N, utilizándose actina como control de carga. Además, la polimerasa viral L presentó un tamaño algo mayor debido al marcador de MT, lo que indica que la proteína con el marcador se expresaba correctamente.

Para analizar por MET las células transfectadas, se incluyeron en resina epoxi y se recogieron secciones ultrafinas en rejillas de cobre. En la Figura 51D se observa un Golgi control de células no transfectadas. En las células transfectadas, se observaron pseudo-partículas virales ensambladas en las cisternas del Golgi que presentaron igual tamaño y morfología que las observadas durante la infección con VBUN. Además, parece que existe el reclutamiento de mitocondrias característico de la infección con VBUN y de RE, concretamente RER, alrededor del Golgi (Figura 51E). Se esperaba encontrar ensamblaje del CR en el aparato de Golgi pero no pseudo-partículas virales, debido a la falta de la proteína NSm, factor importante para la morfogénesis viral, y de las glicoproteínas virales, necesarias también para el ensamblaje de partículas virales. Detalles de las pseudo-partículas virales encontradas se pueden apreciar en las Figuras 51F y G, donde se muestran a mayor magnificación. Se recogieron los sobrenadantes de las células transfectadas, se estudiaron por MET tras tinción negativa y se titularon para analizar la posible liberación de partículas virales infectivas. La titulación de dichos sobrenadantes demostró que de liberarse al medio (no se detectaron partículas por MET) dichas partículas virales no son infectivas, resultado esperable ya que no se están expresando las glicoproteínas virales (Figura 51H). Estos resultados demuestran que las células BSR-T7/5 transfectadas con plásmidos que expresan L-MT y N, producen correctamente las dos proteínas virales. Además, estas dos proteínas son suficientes para ensamblar el CR funcional, detectándose replicación viral por microscopía de fluorescencia. La replicación detectada corresponde a la síntesis del ARN viral, ya que la replicación celular fue inhibida con actinomicina-D. Además, la replicación detectada se concentra en la región perinuclear, posiblemente coincidiendo con el aparato de Golgi, orgánulo donde el VBUN ensambla el CR. La polimerasa viral y la nucleoproteína son suficientes para iniciar el ensamblaje de pseudo-partículas

virales, pero se necesitan el resto de proteínas virales para generar virus infectivos capaces de salir de las células.

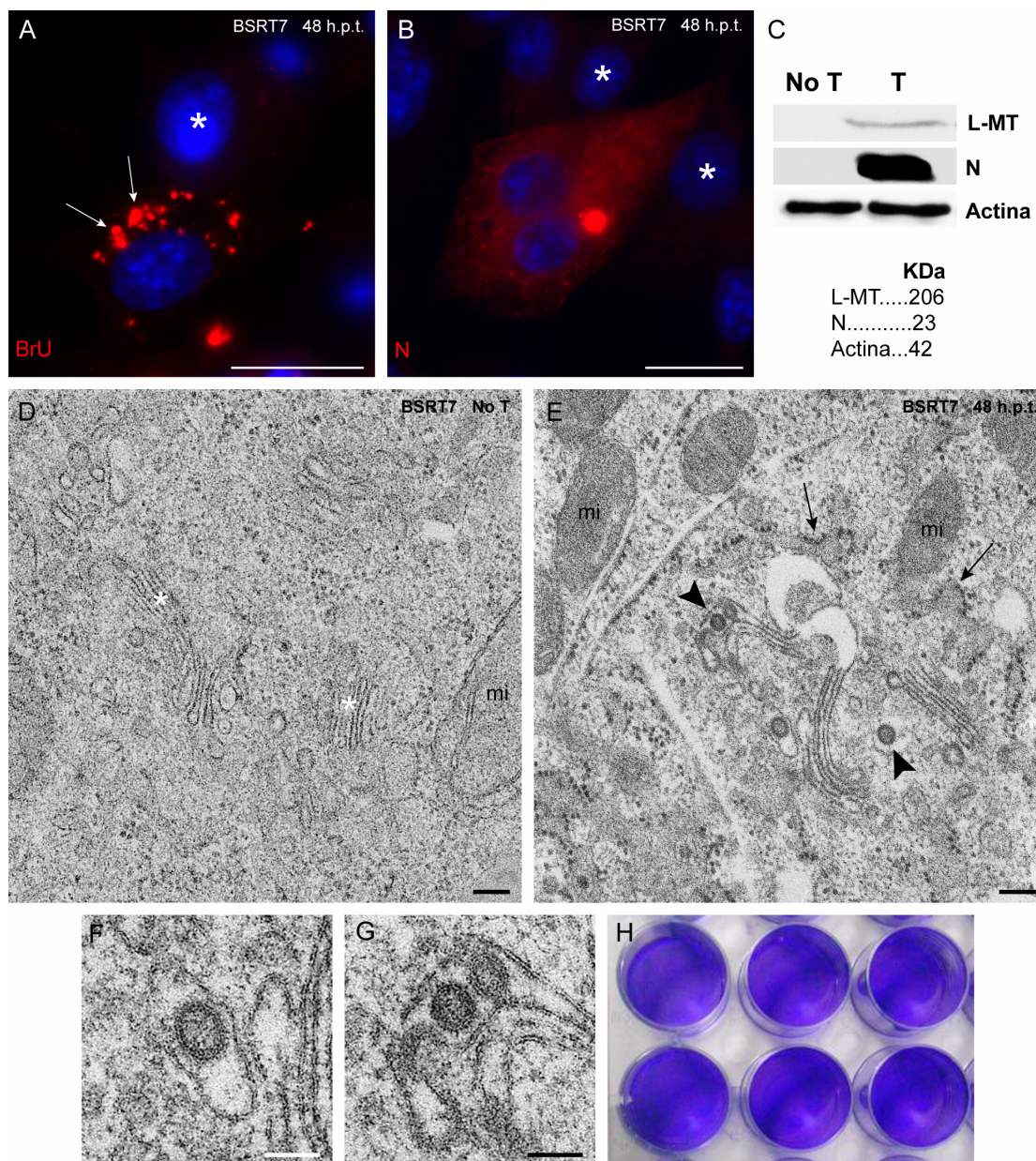


Figura 51. Expresión de proteínas virales en células BSR-T7/5

Se transfectaron células BSR-T7/5 con plásmidos que expresaban la nucleoproteína viral N y la polimerasa L fusionada al marcador de MT (L-MT). Las transfecciones se realizaron con lipofectamina® y los experimentos a las 48 hpt. A) Ensayo de captación de BrU (rojo), se observa una célula transfectada con señal en zona perinuclear (flechas), indicando replicación viral, posiblemente en la zona Golgi. B) Detección de la nucleoproteína N (rojo) con un anticuerpo primario específico en células transfectadas. Los asteriscos (A y B) señalan células no transfectadas y sin señal. Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). C) *Western blot* para detectar las proteínas virales N y L-MT en células transfectadas (T) y no transfectadas (No T), con actina como control de carga. D-G) Se incluyeron células transfectadas y no transfectadas en resina epoxi para el estudio de la ultraestructura mediante MET. D) Células no transfectadas, el asterisco marca el aparato de Golgi.

E) Células transfectadas con pseudo-partículas virales (puntas de flecha) ensambladas en el aparato de Golgi, el RER (flechas) y las mitocondrias (mi) rodean la factoría viral. F y G) Imágenes a mayor magnificación de las pseudo-partículas virales observadas en E. H) Titulación viral de los sobrenadantes de células transfectadas. Barras: 25 μ m en A y B; 200 nm en D y E; 100 nm en F y G.

Células BSR-T7/5 transfectadas con lipofectamina® para la expresión de la polimerasa viral L-MT y la nucleoproteína N, se trataron con oro (HAuCl₄) para la formación de los clusters en MT. En la Figura 52A se observa la localización intracelular de la polimerasa viral, la cual, se acumula en las membranas de un orgánulo celular, probablemente el aparato de Golgi dada su localización y tamaño. Parece que la polimerasa L se acumula en dichas membranas, antes de la formación del CR. Cuando se ensambla el CR, parte de la polimerasa se localiza en los tubos virales, detectándose una alta concentración en el interior de las esférulas (Figuras 52B y C) donde se distribuye formando láminas o filamentos. La mayor acumulación y el empaquetamiento denso de L-MT en las esférulas, es coherente con datos previos que indicaron que la polimerasa es activa en dichas estructuras (Fontana *et al.*, 2008); su organización en esférulas corresponde por tanto a la de los CRs activos. La técnica METTEM ha permitido visualizar diferencias en la organización de las moléculas de polimerasa viral L en las membranas de la factoría, antes y después de su ensamblaje en los tubos virales, que son los orgánulos de replicación del VBUN, y en los que las moléculas forman agregados densamente empaquetados que son activos en replicación.

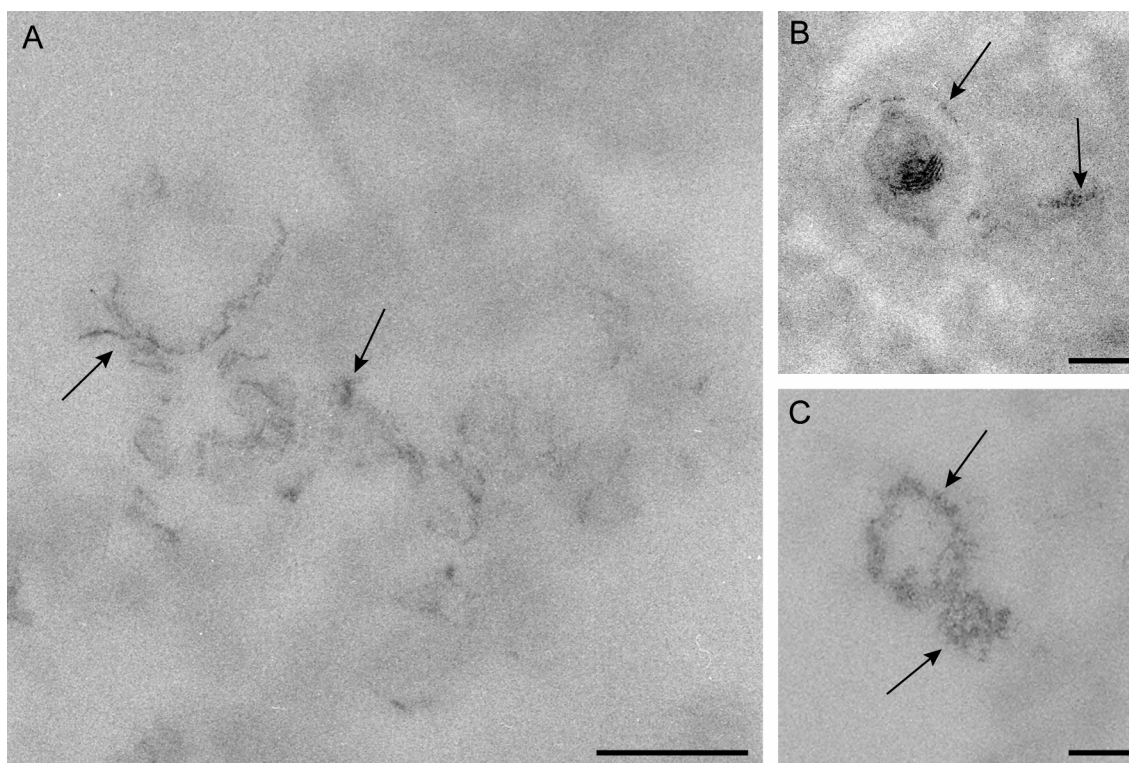


Figura 52. Localización de la polimerasa de VBUN en células BSR-T7/5

Se transfectaron células BSR-T7/5 con plásmidos que expresaban la polimerasa viral L unida al marcador MT y la nucleoproteína N. A las 48 hpt, se trataron con HAuCl_4 para la generación de los nanoclusters de MT, se fijaron y se analizaron por MET. A) Distribución de la polimerasa viral L-MT en endomembranas celulares. Las flechas señalan los clusters de L-MT, de 1 nm de diámetro, aproximadamente. B y C) Esférulas de VBUN con clusters de L-MT. Las moléculas de polimerasa viral están densamente empaquetadas en las esférulas (B). Las moléculas de L-MT también se localizan en los tubos o prolongaciones de las esférulas de menor diámetro (C). Las flechas en B y C marcan los clusters de L-MT en el CR del VBUN (esférulas y tubos). Barras: 200 nm en A; 100 nm en B y C.

2.3. Proteínas celulares implicadas en la infección viral

2.3.1. Proteínas mitocondriales

Cómo se describió en la introducción, las mitocondrias desempeñan un papel clave durante las infecciones virales, siendo reclutadas a las factorías en las fases tempranas de la infección. Sería interesante saber que proteínas están implicadas en esta agregación o concentración de las mitocondrias. Por ello, se analizaron dos proteínas mitocondriales, p32 y mitofusina-2 (Mfn-2) para estudiar su posible relación con las factorías del VBUN. Se seleccionaron estas dos proteínas para el estudio porque: Mfn-2 es una proteína mitocondrial, pero también interviene en los contactos entre mitocondrias y entre mitocondrias y RER, los dos orgánulos que se reclutan alrededor del Golgi en la factoría del VBUN. En el caso de p32 es una proteína mitocondrial pero viaja desde las mitocondrias hasta el núcleo a través del citoplasma. P32 ha sido localizada en la factoría del VRUB y se la relaciona con varios virus ARN. Se infectaron células Vero y se realizaron inmunofluorescencias con anticuerpos primarios que reconocían p32 y Mfn-2. Se usó un anticuerpo específico de la proteína viral Gc para identificar las células infectadas. Se estudió la dinámica de estas proteínas celulares en células control y células infectadas con VBUN a las 4 y 8 horas. En la Figura 53A se observa la distribución citoplásmica de Mfn-2 en células control. En células infectadas a las 4 hpi se detecta algo de proteína viral Gc, y la señal de Mfn-2 se concentra en la zona de la factoría viral, aunque parece que se reduce la señal de Mfn-2 en las células infectadas (Figura 53B). A las 8 hpi hay gran cantidad de proteína Gc en células infectadas pero no se detectó Mfn-2 en dichas células (Figura 53C). En el caso de p32, parece que el patrón de expresión de esta proteína también se ve alterado con la infección viral (Figuras 53D, E y F), si se compara con la distribución de esta proteína en células control. A tiempos tardíos de la infección viral, 8 hpi se observaron dos patrones principales de localización. Por un lado, existen células en las que la señal de p32 se concentra en una zona de la célula coincidiendo con la factoría viral. En las células que se infectaron antes y presentaron mayor cantidad de señal Gc, parece que se pierde la señal de p32 (Figura 53F). Estos resultados apuntan a cambios en los patrones de expresión y localización de las proteínas mitocondriales p32 y Mfn-2 durante la infección viral.

La pérdida de señal en células infectadas podría ser debido a una falta de expresión o degradación de p32 y Mfn-2, por ello se realizó un *western blot* en células control e infectadas (8 hpi).

En la Figura 53G se muestra cómo la infección por VBUN no afecta a la expresión de p32 y Mfn-2, obteniéndose unas bandas de 32 y 87 KDa, correspondientes a las dos proteínas mitocondriales. Por lo tanto, la pérdida de señal a 8 hpi no es debido a que las proteínas no se están expresando o degradando. Junto con la localización de las factorías, estos resultados sugieren que dichas proteínas podrían tener una función en las factorías virales. Su conformación podría haber cambiado con la infección viral o podrían estar interaccionando con otras proteínas, lo que explicaría que ya no fuesen reconocidas por los anticuerpos.

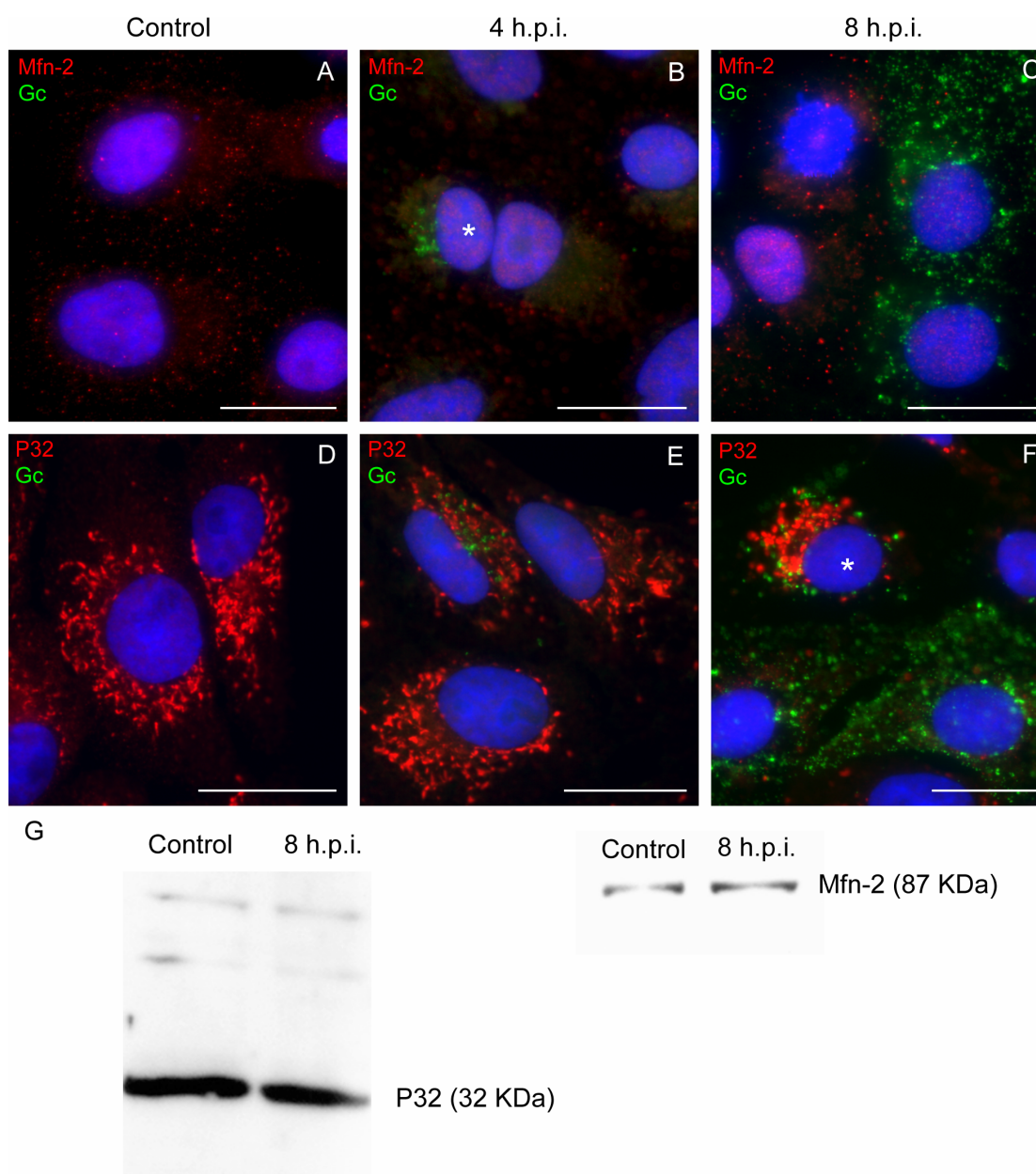


Figura 53. Cambios en el patrón de localización/expresión de proteínas mitocondriales con la infección viral

Se utilizaron células Vero no infectadas (control) e infectadas a 1 UFP/célula fijadas a 4 y 8 hpi para la localización de proteínas. A-F) Se utilizaron anticuerpos primarios para la detección de la proteína viral Gc (verde) y las proteínas mitocondriales (rojo) Mfn-2 y p32, y secundarios conjugados con sondas fluorescentes. El núcleo se marcó con DAPI (azul). Localización de Mfn-2 (A) y p32 (D) en células control. Distribución de Mfn-2 en células infectadas (B y C), el asterisco en B marca una célula infectada en etapa temprana con señal Gc en región perinuclear y menor señal de Mfn-2 que en células control. E y F) Localización de p32 en células infectadas. El asterisco en F marca una célula infectada con concentración de la señal de Gc y p32 en zona perinuclear. G) *Western blot* para la detección de p32 y Mfn-2 en células Vero control e infectadas 8 hpi. Barras: 25 μ m en A-F.

Para obtener más información acerca de la localización de estas proteínas mitocondriales durante la infección viral y evitar los marcajes con anticuerpos cuya señal se pierde durante la progresión de la infección, se transfectaron con lipofectamina® células Vero con plásmidos que expresaban p32-GFP y Mfn-2-YFP, respectivamente. Hasta las 24 hpt no se detectó expresión de las proteínas y se valoraron tres tiempos post-transfección 24, 48 y 72 horas. El experimento se realizó a las 48 hpt porque a este tiempo se obtuvo la mejor eficiencia de transfección, aunque no se consiguió un gran número de células transfectadas (18% en el caso de Mfn-2 y 22% para p32). Se observó que el protocolo de transfección con lipofectamina®, posiblemente afecta a la infección viral, siendo muy pocas las células que se infectaban a 1UFP/célula. El VBUN entra en las células por endocitosis mediada por receptor, si la superficie celular está alterada, quizás se esté inhibiendo parcialmente la entrada del virus. La lipofectamina® podría afectar a los receptores de la superficie celular que son reconocidos por el virus. Otra posibilidad sería que dos proteínas potencialmente claves para la infección como p32 y Mfn-2, fueran menos funcionales en las factorías al llevar unida la GFP o la YFP, afectando a la dinámica de la infección. Finalmente, se obtuvo un alto porcentaje de células infectadas incrementando el tiempo post infección y añadiendo mayor cantidad de virus.

Por lo tanto, se infectaron células Vero a las 48 hpt a 5UFP/célula durante 6 y 12 horas, para la detección de las proteínas mitocondriales y de la glicoproteína viral Gc mediante microscopía de fluorescencia. En células no infectadas, p32-GFP se distribuye dando una señal citoplásmica y concentrándose, ocasionalmente, en gránulos localizados en el núcleo y también en el citosol (Figura 54A). A las 6 hpi se observan gránulos de p32 que se concentran en la zona perinuclear, coincidiendo con la factoría viral (Figura 54B). Sin embargo, a las 12 hpi p32-GFP muestra un patrón punteado por todo el citoplasma, semejante al de la proteína Gc y muy distinto al de las células control (Figura 54C). Estos resultados indican que la proteína p32 cambia drásticamente su localización durante la infección viral. En células infectadas su patrón de expresión es distinto al de las células control y también es diferente según progresa la infección. Así, p32 se concentra en región perinuclear en etapas tempranas, cuando la proteína viral Gc se localiza mayormente en el aparato de Golgi. A 12 hpi se detecta señal Gc por todo el citosol y también p32 con un patrón punteado y sin la acumulación en gránulos característica de células no infectadas. La infección viral parece inducir un cambio drástico en el patrón de expresión de p32, el cual, se vuelve punteado y con una distribución que coincide con la de las membranas del

Golgi y con la proteína viral Gc. Por lo tanto, parece que la proteína se va a las mini-factorías y que, posiblemente, se concentre en ellas.

En la Figura 54D, se muestra la distribución citoplásmica de Mfn-2-YFP en células control, con acumulaciones grandes de proteína. En células infectadas, la proteína ya no se localiza en todo el citoplasma sino que aparece concentrada en región yuxtannuclear, rodeada de señal Gc (Figuras 54E y F). A pesar de que Mfn-2 y p32 se concentran en un área próxima al núcleo los dos patrones son diferentes, p32 forma gránulos, mientras que Mfn-2 define una estructura única y grande. Estos datos de fluorescencia muestran de nuevo el característico reclutamiento de mitocondrias durante la infección viral. Mfn-2 se concentra en células infectadas en la zona de factoría viral y su distribución general cambia radicalmente con respecto a células control, acompañando a las factorías virales al igual que sucede con la proteína p32.

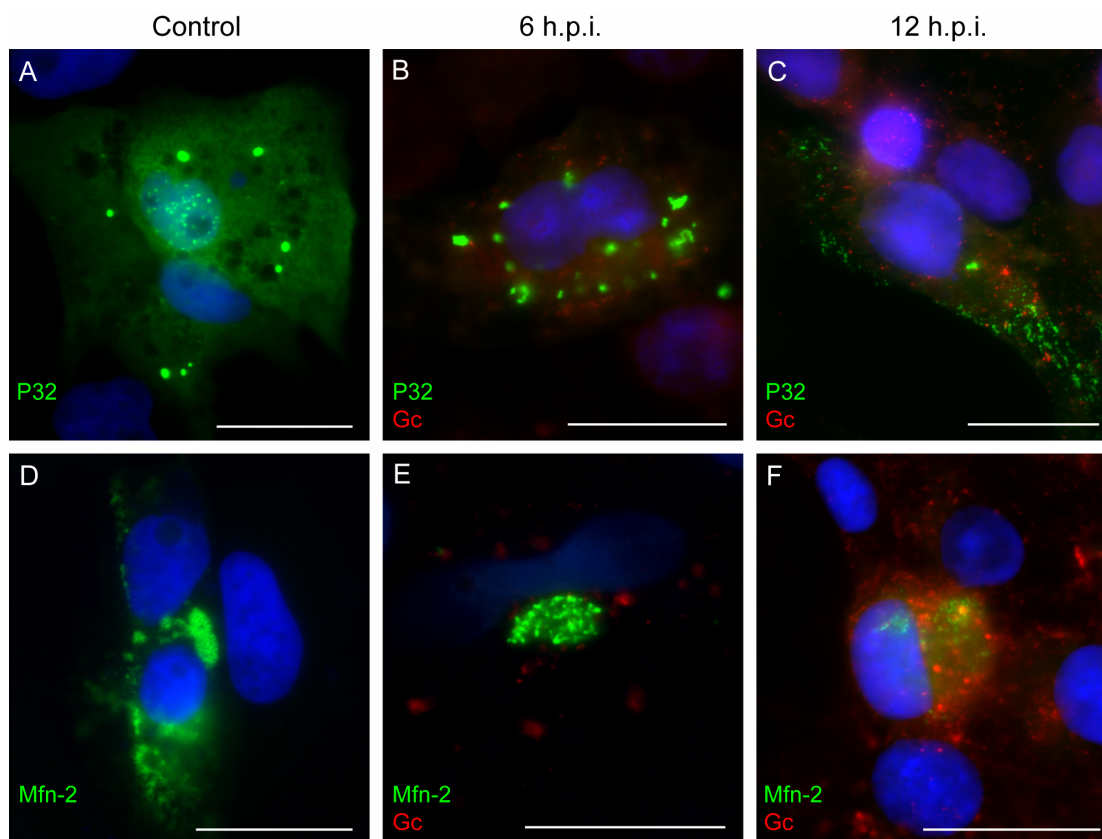


Figura 54. Reclutamiento de p32-GFP y Mfn-2-YFP a la factoría viral

Se transfectaron células Vero con plásmidos que expresaban p32 y Mfn-2 unidas a proteínas fluorescentes (GFP y YFP, respectivamente). A las 48 hpt se infectaron a 5UFP/célula y se fijaron a las 6 y 12 hpi. Para identificar las células infectadas se utilizó un anticuerpo primario que reconoce la proteína viral Gc y un secundario conjugado con una sonda fluorescente (rojo). Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). A y D) Localización de p32-GFP y Mfn-2-YFP (verde) en células Vero control. B y E) Concentración de p32-GFP y Mfn-2-YFP a las 6 hpi en zona perinuclear, coincidiendo con la

señal Gc. C) Dispersión de p32-GFP generando un patrón punteado en células infectadas a las 12 hpi. F) Distribución de Mfn-2-YFP en la zona de las factorías virales. Barras: 25 μ m.

2.3.2. Miosina-9

La miosina-9 o NMHC-IIA fue una de las proteínas celulares detectadas en los orgánulos de replicación o tubos virales purificados de células BHK-21 infectadas con VBUN, mediante espectrometría de masas MALDI-TOFF (Fontana *et al.*, 2008). El complejo actina-miosina desempeña un importante papel en el transporte de vesículas y proteínas en el interior de la célula. Para mediar los procesos de transporte, parte de la proteína se localiza en el aparato de Golgi en condiciones normales. Además, se ha demostrado que esta proteína desempeña importantes funciones en infección por VHS-1. Debido a estas razones, se decidió estudiar si la NMHC-IIA se localizaba en las factorías *in situ* y si podría participar en el transporte de RNPs desde el orgánulo de replicación al sitio de ensamblaje.

Para determinar si se producían cambios en el patrón de expresión de NMHC-IIA en células infectadas con VBUN, se transfectaron células Vero con plásmidos que expresaban NMHC-IIA-GFP. En la Figura 55A se observa que la miosina-9 se localiza en el citosol con patrón filamentoso en células no infectadas. Se infectó a 5 UFP/célula durante 10 y 12 hpi, ya que como se ha comentado anteriormente, al transfectar con lipofectamina® hubo que forzar las condiciones de infección para incrementar el número de células infectadas. En células infectadas aparecen acumulaciones o gránulos de miosina que frecuentemente, se superponen con la señal de la proteína Gc (Figuras 55B y C). Posteriormente, se realizaron marcajes con gigantina, para determinar si la señal de NMHC-IIA estaba asociada al aparato de Golgi. En las Figuras 55D, E y F se muestra la señal de gigantina y miosina-9 en células no infectadas. La señal de gigantina se concentra en la zona perinuclear, mostrando el Golgi, mientras que la miosina-9 se distribuye por todo el citoplasma. En células infectadas, la señal NMHC-IIA se concentra en fragmentos de Golgi, donde también se acumula la proteína viral Gc (Figuras 55D-L). Los resultados demuestran que la proteína NMHC-IIA cambia de localización en células infectadas, es reclutada a la factoría viral, donde se acumula en el aparato de Golgi formando gránulos.

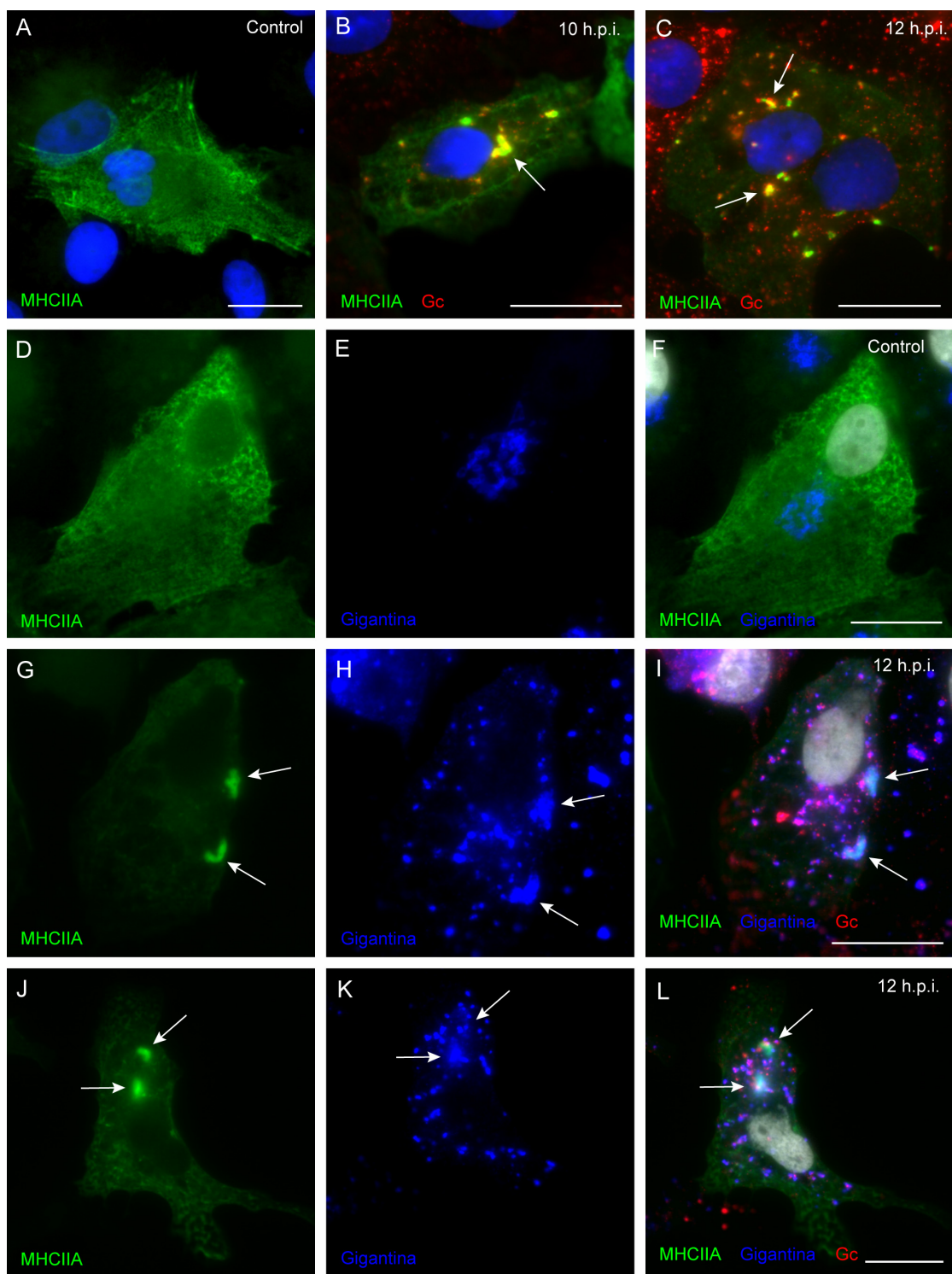


Figura 55. La miosina-9 es reclutada a la factoría viral en células infectadas con VBUN

Se transfectaron con lipofectamina® células Vero con plásmidos que expresaban NMHC-IIA-GFP. A las 48 hpt se infectaron con VBUN a 5UFP/célula durante 10 y 12 horas, analizándose mediante microscopía de fluorescencia. La proteína viral Gc (rojo) y gigantina (marcador de Golgi, azul) se detectaron con anticuerpos primarios específicos. A-C) Distribución de NMHC-IIA (verde) en células control (A) e infectadas 10 hpi (B) y 12 hpi (C), los núcleos se marcaron con DAPI (azul).

D-L) Localización de NMHC-IIA (verde), gigantina (azul) y Gc (rojo) en células control e infectadas 12 horas. Los núcleos se tiñeron con DAPI (gris). Las flechas señalan factorías virales que contienen NMHC-IIA, gigantina y Gc. Barras: 25 μ m.

La blebistatina es un inhibidor específico de la NMHC-IIA, por lo que se escogió esta droga para bloquear la miosina-9. Para estudiar el efecto de la droga sobre la infección viral, se trataron células Vero con 50 μ M de blebistatina durante 60 min y fijando a distintos tiempos post infección, se observó un efecto de la droga a las 12 hpi.

Se estudió el efecto de la droga en células infectadas por VBUN utilizando anticuerpos anti-gigantina y anti-Gc como marcadores de Golgi y de la infección viral, respectivamente. En la Figura 56A se muestra cómo la señal de gigantina presenta un patrón normal en células no infectadas y tratadas por la droga. Parece que el Golgi no se ve alterado con el tratamiento. A las 12 hpi el Golgi se fragmenta en células tratadas y no tratadas con blebistatina (Figura 56C), pero en las células tratadas parece que la proteína Gc está siendo retenida en el Golgi (Figura 56B), siguiendo un patrón muy semejante al que muestran las células tras 4 hpi (Figura 49E). Sin embargo, como se puede apreciar en la Figura 56C en células no tratadas, la proteína Gc se extiende por todo el citoplasma a las 12 hpi, debido al progreso de la infección. En las Figuras 56E y F se muestran detalles de la imagen de confocal de células infectadas 12 horas y tratadas con blebistatina (Figura 56D). En estas imágenes se puede observar cómo la proteína Gc queda retenida en el Golgi. Estos resultados indican que el tratamiento con blebistatina provoca la retención de la proteína Gc en las cisternas del aparato de Golgi. Gc se concentra en las membranas de la factoría pero no sale de ellas en forma de virus en vesículas de secreción, posiblemente, porque no le llegan las RNPs. Por lo tanto, NMHC-IIA podría desempeñar un papel clave en el transporte de las RNPs entre las distintas zonas de la factoría viral.

Para obtener más información sobre esta posibilidad, se estudió mediante MET el CR de VBUN en células tratadas con blebistatina y se comparó con células no tratadas. En las Figuras 56H e I, se muestran esférulas que poseen con frecuencia un tamaño mayor que en células no tratadas (Figura 56G). Además, presentaron en su interior gránulos y fibras. Este resultado sugiere una acumulación de las RNPs en las esférulas de los tubos virales, por lo que la proteína NMHC-IIA puede ser necesaria para el transporte de las RNPs al sitio de ensamblaje.

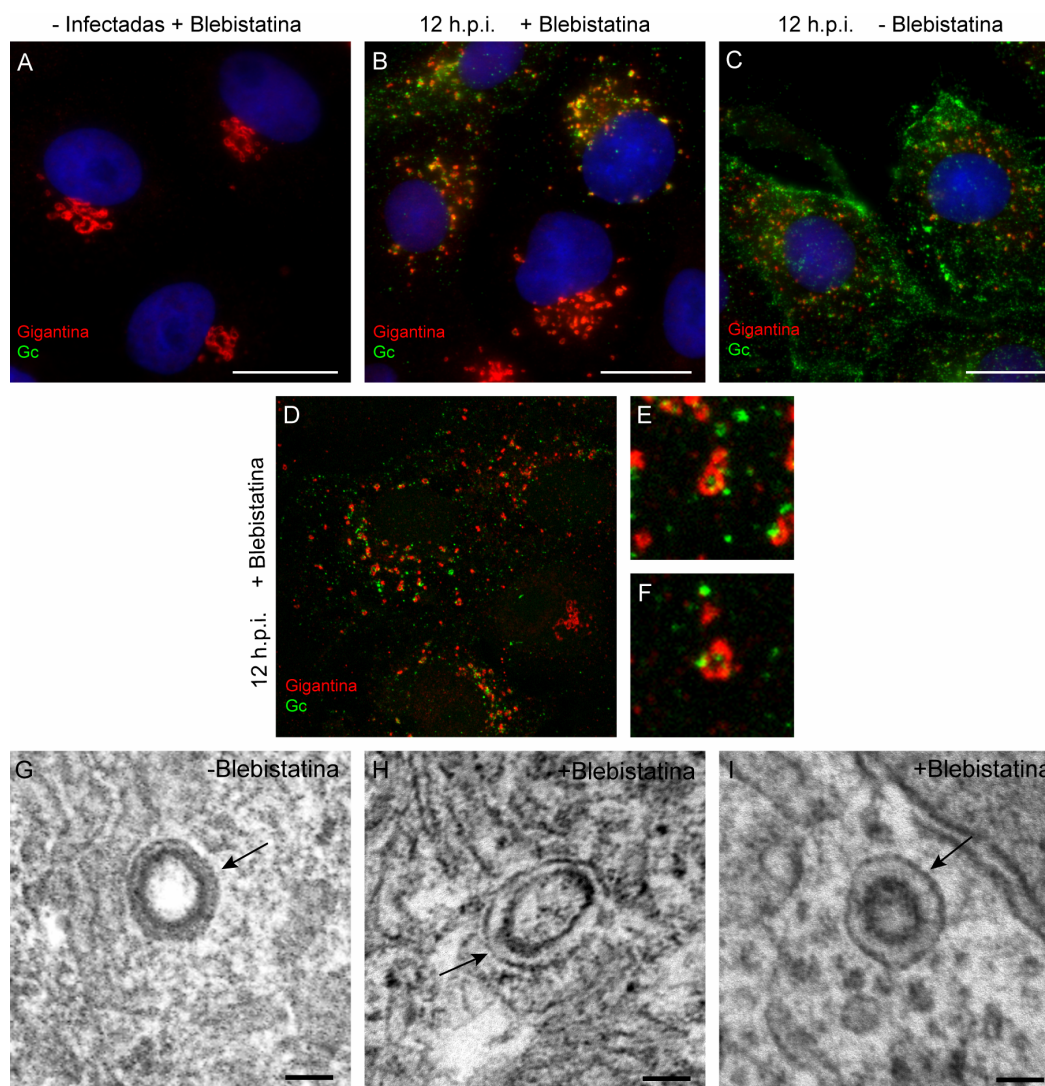


Figura 56. Posible participación de la miosina-9 en el transporte de RNPs en las factorías virales

A-F) Se trataron con blebbistatina células Vero infectadas con VBUN a 1UFP/célula. Se utilizó un anticuerpo que reconoce gigantina (rojo) como marcador de Golgi y un anticuerpo frente a la proteína viral Gc (verde), los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). A) Células no infectadas y tratadas con blebbistatina 60 min. B) Células infectadas 12 hpi y tratadas con la droga. C) Células infectadas 12 hpi y no tratadas con blebbistatina. D) Proyección de secciones ópticas obtenidas por microscopía confocal de células infectadas 12 hpi y tratadas con la droga. E y F) Detalles de D. G, H e I) Secciones ultrafinas de células Vero infectadas a 1UFP/célula y 12 hpi con VBUN, no tratadas y tratadas con blebbistatina, incluidas en resina epoxi y estudiadas por MET. Las flechas señalan las esférulas o dominios globulares de los tubos virales, en células no tratadas (G) y tratadas con la droga (H e I), se muestra que en células tratadas las esférulas presentan una mayor densidad electrónica y material fibroso en su interior. Barras: 25 μm en A-C; 100 nm en G, H e I.

2.4. Estudio estructural de virus purificados

Los virus infectivos son el producto de las actividades de las factorías virales. La factoría del VBUN ha sido caracterizada con detalle a nivel estructural en células de mamífero BHK-21 (Fontana *et al.*, 2008) y Vero (esta tesis doctoral) pero en células del mosquito vector se dispone de datos escasos

(Lopez-Montero and Risco, 2011). Datos bibliográficos apuntan a que deben existir diferencias importantes en la ruta morfogénica del VBUN dentro de las factorías de células de mamífero y mosquito (Kohl *et al.*, 2004; Bridgen *et al.*, 2001; Newton *et al.*, 1981). Estas diferencias podrían explicar parcialmente el menor daño que el virus provoca en las células del infecto vector. Con esta idea se realizó un estudio preliminar de los virus liberados por células de mamífero (Vero) y del mosquito vector (C6/36).

Se purificaron virus a partir de células de mamífero (BHK-21) para su estudio por MET. La purificación se realizó con un gradiente de Optiprep® obteniéndose distintas fracciones, algunas de ellas con alta concentración de virus, que fueron las que se utilizaron para el estudio. Se realizaron tinciones negativas para estudiar el estado de los virus. En la Figura 57A se aprecian virus que poseen un diámetro de unos 100 nm y RNPs, las cuales, se pueden visualizar debido a que algunos virus se rompieron durante la purificación, liberando las RNPs al medio. Para estudiar mejor las RNPs se provocó la rotura de los virus con ciclos sucesivos de congelación-descongelación. Así, en las Figuras 57B y C se observan virus rotos por un vértice con las RNPs saliendo al exterior. Detalles de las RNPs visualizadas tras tinción negativa se muestran en las Figuras 57D, E y F; las RNPs presentaron una estructura relajada sin una marcada simetría helicoidal.

Para determinar el contenido proteico de los virus se llevó a cabo un *western blot*. En la Figura 57G se muestra la comparación del contenido proteico de virus procedentes de células de mamífero (BHK-21) y del mosquito vector (C6/36). En ambos casos se detectaron las proteínas estructurales virales: Gc, Gn y N. Las proteínas no estructurales (NSm y NSs) no se detectaron ya que no están presentes en el virus. En el caso de la polimerasa L se obtuvo una banda muy débil que se observaba al sobreexponer el negativo. Aunque la polimerasa L está en los virus purificados, no es fácil detectarla. No se dispone de buenos anticuerpos frente a dicha proteína y se requieren altas concentraciones de polimerasa viral para detectarla.

Posteriormente, se estudió la accesibilidad de los epítomos de las glicoproteínas en la superficie de virus purificados a partir de los dos tipos celulares (mamífero y mosquito). Se realizaron inmunomarcajes con anticuerpos que reconocían Gc y Gn, respectivamente. Las glicoproteínas se detectaron con anticuerpos secundarios conjugados con partículas de oro de 10 nm. Así en la Figura 57H se observó que la superficie de los virus producidos por células de mamífero y de mosquito reaccionaron con el anticuerpo monoclonal anti-Gc, que reconoce un epítipo en la glicoproteína de mayor tamaño Gc; este epítipo se genera cuando la proteína ya ha completado el plegamiento que da lugar a la conformación "madura" de virus infectivos extracelulares. Sin embargo, la glicoproteína de menor tamaño Gn sólo fue detectada en la superficie de los virus liberados por células de mosquito.

Estos resultados demuestran que el contenido en proteínas virales es similar en el caso de virus purificados a partir de mamífero o mosquito. Sin embargo, la organización de glicoproteínas de la envuelta es diferente, el epítipo que reconoce el anticuerpo anti Gn esta accesible en virus purificados de células de mosquito y enmascarado en virus procedentes de mamífero. Esto apunta a diferencias en las rutas de morfogénesis del VBUN en las factorías virales de ambos tipos celulares.

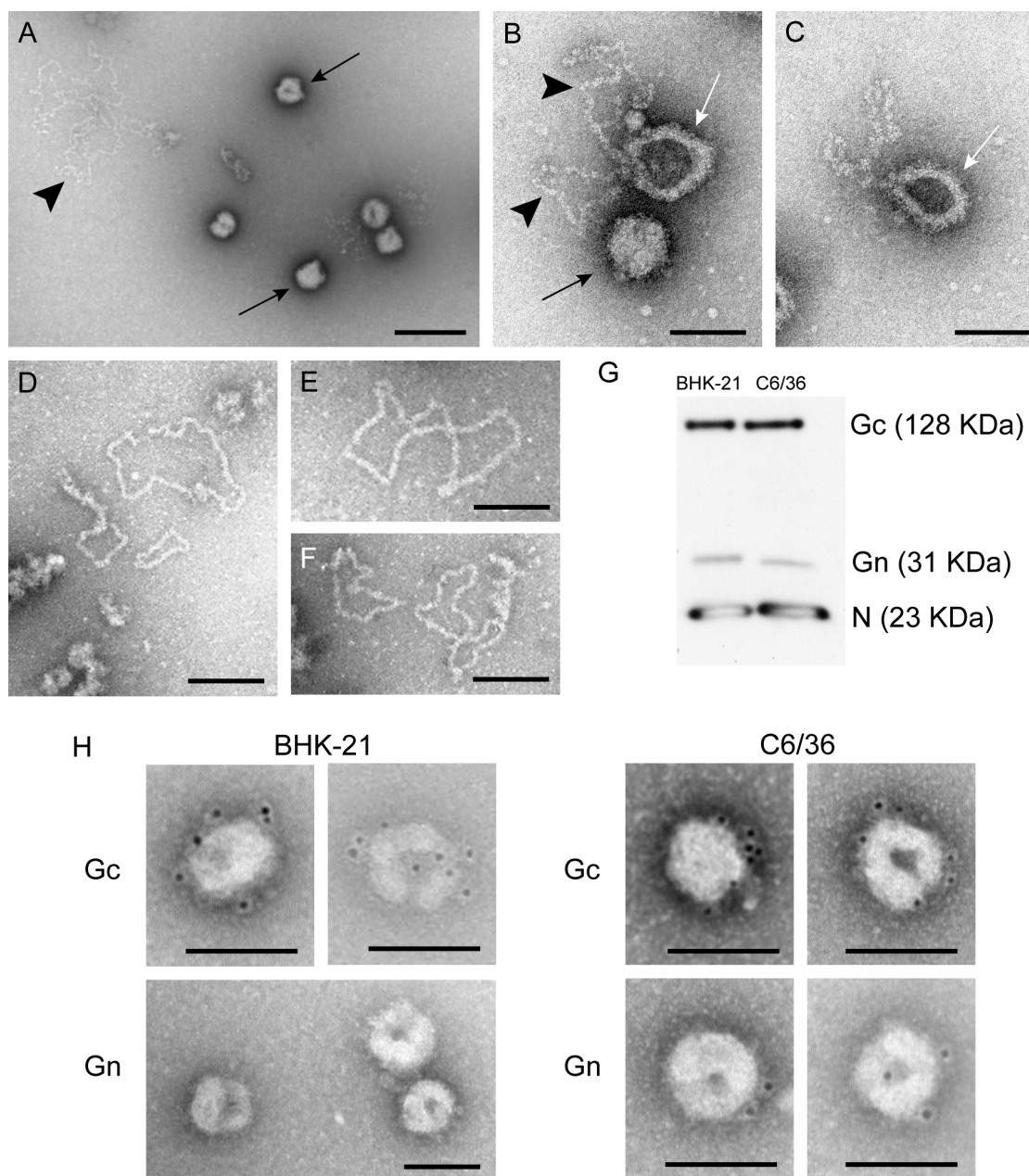


Figura 57. MET de virus Bunyamwera y detección de glicoproteínas en virus purificados

Se purificaron virus a partir de células de mamífero (BHK-21) y mosquito (C6/36) mediante un colchón de sacarosa y un gradiente de Optiprep®. Se realizaron tinciones negativas para visualizar los virus y las RNPs. A, B y C) Virus Bunyamwera (flechas negras) de 100 nm de diámetro, aproximadamente, las flechas blancas señalan virus rotos mediante ciclos de congelación-descongelación. La rotura de algunos virus facilitó la observación de RNPs saliendo de los virus (puntas de flecha). D, E y F) Detalle de las RNPs en el medio. G) *Western blot* para la detección de proteínas virales en células de mamífero (BHK-21) y del mosquito vector (C6/36). H) Inmunomarcaje de virus procedentes de BHK-21 y C6/36 con anticuerpos frente Gc y Gn. Barras: 200 nm en A; 100 nm en B, C, D, E, F, H.

3. Reovirus

3.1. Estudio de las inclusiones formadas por reovirus mediante MET

Las inclusiones de reovirus se estudian desde hace muchos años (Ooms *et al.*, 2012; Tunkara *et al.*, 1984; Dales *et al.*, 1965; Dales, 1963). Sin embargo, no se conoce su organización detallada, y la posible implicación de orgánulos y endomembranas en su estructura y biogénesis están por definir.

Para determinar que orgánulos celulares estaban implicados en la generación de las inclusiones de reovirus, se realizó un estudio de secciones ultrafinas de células infectadas que reveló la presencia de mitocondrias, membranas y microtúbulos en las estructuras inducidas por el virus (Fernández de Castro *et al.*, 2014). El análisis detallado de la organización de dichas inclusiones o factorías se realizó en modelos 3D, elaborados a partir de secciones seriadas. Se analizaron un total de nueve series y reconstrucciones 3D; permitiendo obtener nueva información sobre la estructura y biogénesis de las inclusiones de reovirus. Así, se estudiaron dos líneas celulares: Hela y MDCK (*Madin-Darby canine kidney*) y dos cepas de reovirus T3 y T3-T1M1. Las cepas de reovirus difieren en su capacidad para completar el ciclo de replicación en células MDCK. Aunque T3 puede infectar células MDCK y formar inclusiones virales, el rendimiento en la producción de virus es mucho menor que con T3-T1M1. Por ello, en el caso de las células MDCK, se puede obtener infección permisiva con la cepa T3-T1M1 o no permisiva si se infecta con el virus T3 (Ooms *et al.*, 2012). Se utilizaron monocapas de células infectadas con reovirus para obtener secciones seriadas y orientadas. Las infecciones fueron realizadas por la Dra. Laura Ooms (*Vanderbilt University*, Tennessee, EEUU) en el laboratorio del Dr. Terry Dermody (*Vanderbilt University*, Tennessee, EEUU). Posteriormente, las muestras se analizaron mediante MET de secciones ultrafinas seriadas y las imágenes fueron procesadas para generar la reconstrucción 3D. En la Figura 58A se muestra cómo en el modelo 3D las inclusiones en células Hela están formadas por membranas rodeadas de mitocondrias. En la mayoría de las orientaciones del volumen, se observaron contactos entre las mitocondrias y las membranas de la inclusión viral (Figura 58B). El RER también contacta con el entramado de membranas de la inclusión viral, y está adyacente a las mitocondrias. En la Figura 58A y B se observan microtúbulos y partículas virales embebidos dentro de las membranas de la inclusión. Además, se muestra una imagen 2D (Figura 58C) correspondiente a una de las secciones de la serie utilizada para generar el modelo 3D, observándose partículas virales llenas y vacías (virus maduros e inmaduros, respectivamente) en un entramado de membranas. Dicho entramado está rodeado de mitocondrias y membranas del RE. La información obtenida con el modelo 3D es más completa que la obtenida con la imagen 2D, debido a que es la suma de varias secciones consecutivas.

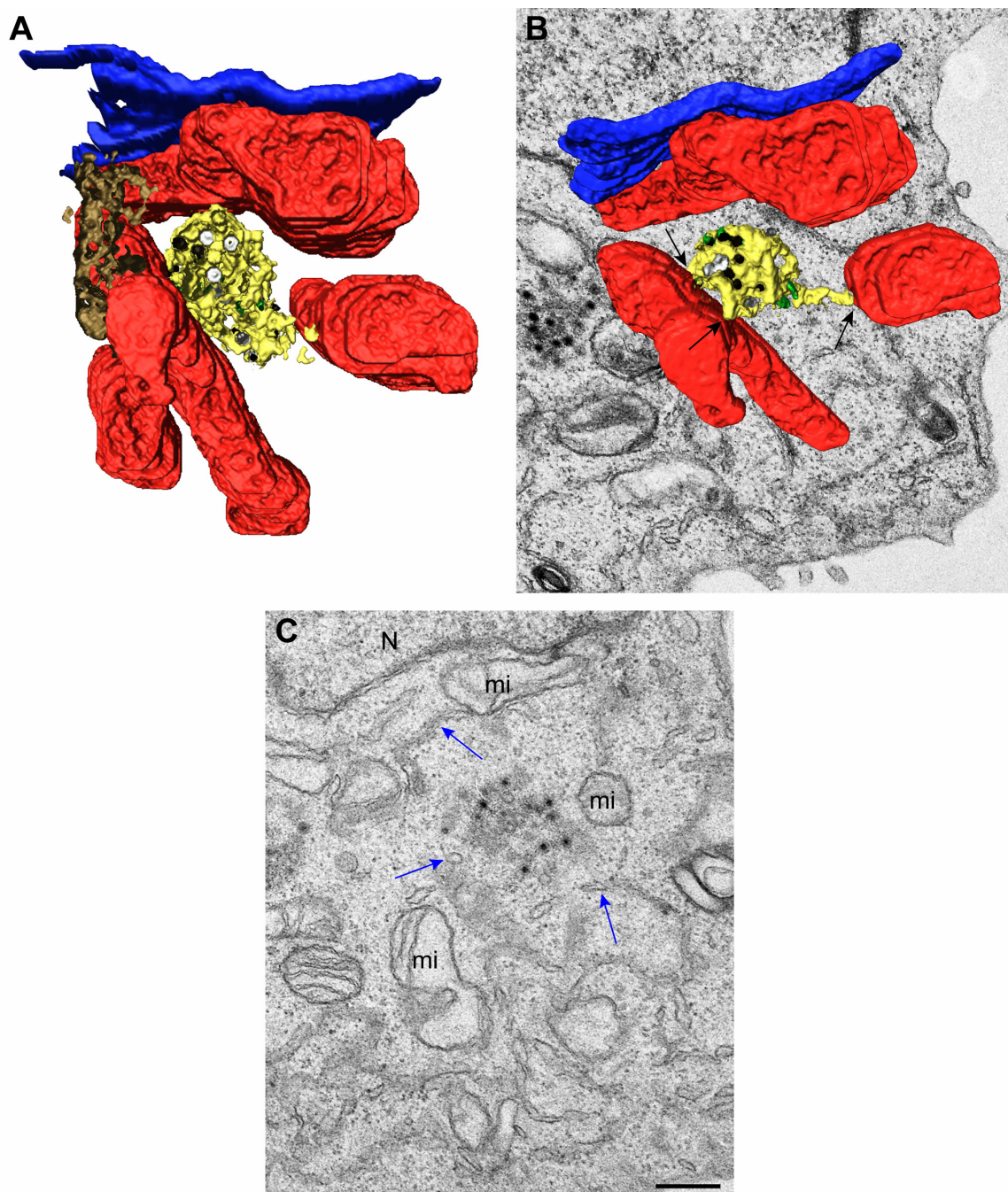


Figura 58. Modelo 3D de las inclusiones de reovirus en células Hela

Células Hela se infectaron con T3-T1M1 y se fijaron a las 12 hpi. La inclusión viral se visualizó mediante MET de secciones seriadas y reconstrucción 3D. A) Mitocondrias (rojo) rodeando un entramado de membranas (amarillo). El RER (marrón) y la envuelta nuclear (azul) se encuentran adyacentes a la inclusión. Los microtúbulos (verde) junto con las partículas virales llenas (negro) y vacías (blanco) están integrados en el entramado de membranas. B) Rotación de la misma reconstrucción muestra contactos entre las membranas de la inclusión viral y las mitocondrias (flechas). El volumen se superpuso sobre una de las imágenes 2D de la serie. C) Una de las secciones de la serie utilizada para obtener reconstrucción 3D mostrada en A y B. La inclusión viral está muy próxima al núcleo (N) y rodeada de mitocondrias (mi) y membranas de RE (flechas azules) (Fernández de Castro *et al.*, 2014). Barra de 500 nm.

Posteriormente, se estudió si existían diferencias en la morfología de las inclusiones formadas en condiciones permisivas y no permisivas. Se infectaron durante 24 hpi células MDCK con las cepas T3 y T3-T1M1 y se analizaron con MET para generar las reconstrucciones 3D. Se observaron numerosas mitocondrias y RER rodeando las inclusiones formadas en células infectadas por T3-T1M1 (Figura 59A). Las membranas del RER contactan con las membranas de la inclusión viral a las 24 hpi. Además, las inclusiones estaban llenas de virus maduros, partículas vacías y microtúbulos (Figura 59A). Sin embargo, en condiciones no permisivas, las inclusiones no contienen microtúbulos. También existen diferencias en cuanto a las partículas virales, se observaron muy pocos virus maduros y muchas partículas vacías en las inclusiones formadas por T3 en MDCK (Figura 59B). Se pudieron apreciar mitocondrias, RER y cuerpos lipídicos alrededor de la inclusión viral. Por lo tanto, el reclutamiento de orgánulos es semejante al mostrado en condiciones permisivas, pero los microtúbulos están ausentes y la acumulación de virus inmaduros apunta a deficiencias en la morfogénesis viral. En las Figuras 60A y B se muestran dos imágenes 2D correspondientes a dos de las secciones de las series utilizadas para obtener las reconstrucciones 3D mostradas en las Figuras 59A y B, respectivamente. Como se ha dicho anteriormente, en las imágenes 2D se puede observar sólo parte de la información mostrada en el modelo 3D. Las reconstrucciones 3D al generarse a partir de varias secciones poseen información más completa de la estructura, y ofrecen la posibilidad de observar contactos y fenómenos poco frecuentes. En células infectadas con T3-T1M1, se suelen observar inclusiones próximas a la membrana plasmática a las 24 hpi. En la Figura 59C se muestra un modelo 3D de una de las inclusiones donde se observaron partículas virales adyacentes a la membrana plasmática y unidas a membranas, RER y microtúbulos (Figuras 59C-E). Estos resultados demuestran que las inclusiones formadas por reovirus contienen un entramado de membranas donde se ensamblan y acumulan las partículas virales. Además, orgánulos como mitocondrias y RER rodean y establecen contactos con la inclusión, indicando un posible papel durante la replicación viral. Elementos celulares como los microtúbulos o las acumulaciones de lípidos, también se relacionan con las inclusiones virales. Los microtúbulos podrían estar implicados en la formación y mantenimiento de la morfología de la inclusión, así como en el transporte y liberación de virus. Las acumulaciones de cuerpos lipídicos podrían ser importantes como aporte energético durante replicación y morfogénesis viral.

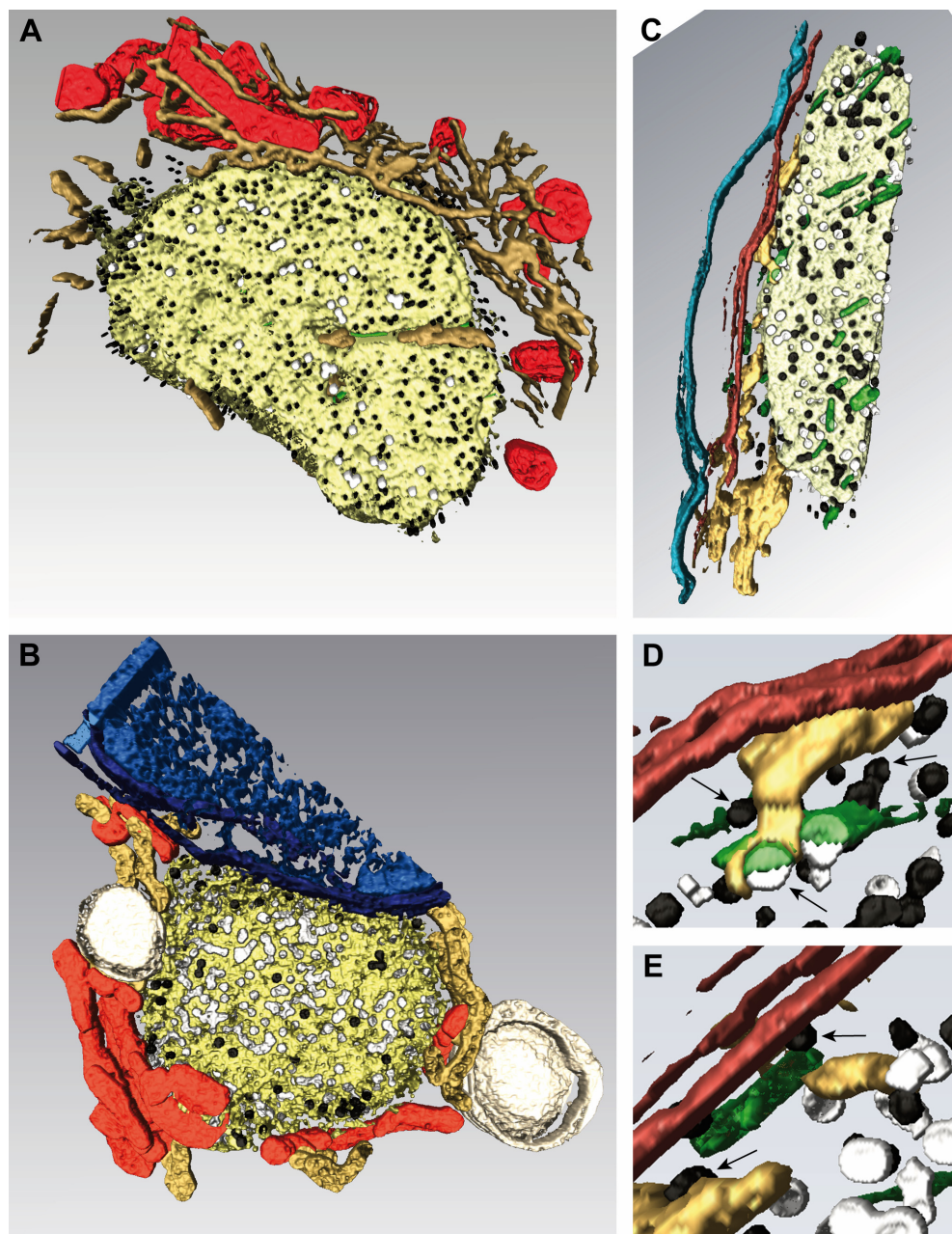


Figura 59. Modelo 3D de una inclusión de reovirus en células MDCK

Células MDCK se infectaron con T3-T1M1 (A y C-E) o con T3 (B) y se fijaron a las 24 hpi. Se muestran: membranas de la inclusión viral (amarillo), mitocondrias (rojo), RER (marrón claro), microtúbulos (verde), partículas virales llenas (negro) y vacías (blanco). A) Reconstrucción de una inclusión formada en células infectadas por T3-T1M1. Membranas del RER rodean y se integran dentro del entramado de membranas de la inclusión viral, que contiene numerosos virus maduros, pocas partículas virales vacías y microtúbulos. B) Reconstrucción de una inclusión viral formada en células infectadas por T3. La mayoría de las partículas virales presentes dentro del entramado de membranas están vacías. No se observaron microtúbulos rodeando o dentro de la inclusión viral. Mitocondrias, RER, y cuerpos lipídicos (estructuras en blanco) rodean la inclusión, la cual, contacta con la envuelta nuclear (azul). C) Reconstrucción de una inclusión viral próxima a la membrana plasmática (marrón) en una célula infectada con T3-T1M1. La membrana plasmática de otra célula próxima se muestra en azul. La inclusión viral contiene membranas (amarillo), y partículas virales llenas (negro) y vacías (blanco). RER, microtúbulos y partículas virales están en contacto con la cara citosólica de la membrana plasmática. Detalles de estas

regiones se pueden apreciar en los paneles D y E. Se observan partículas virales unidas a RER, microtúbulos y membrana plasmática (flechas) (Fernández de Castro *et al.*, 2014).

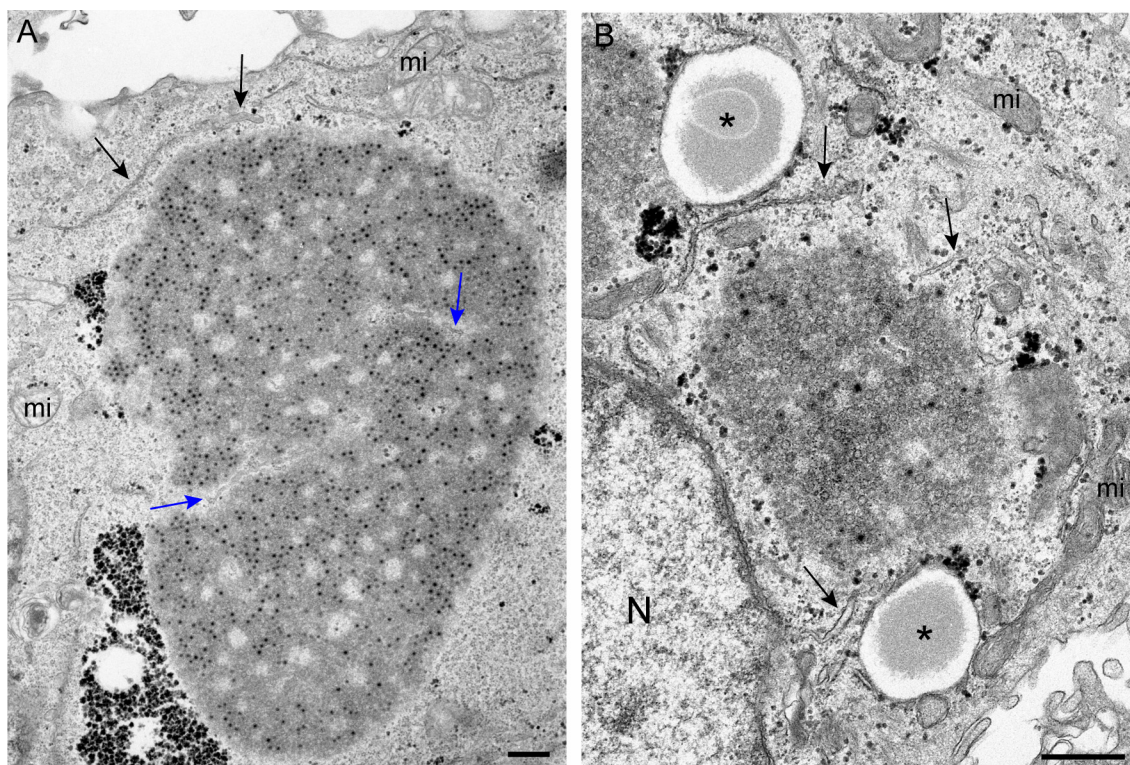


Figura 60. Ultraestructura de las inclusiones de reovirus en condiciones permisivas y no permisivas

Células MDCK se infectaron con T3-T1M1 (A) o con T3 (B) y se fijaron a las 24 hpi. A) MET de una inclusión viral en condiciones permisivas. Se observan gran cantidad de partículas virales llenas y pocas vacías en el entramado de membranas de la inclusión viral. Mitocondrias (mi) y membranas del RE rodean la inclusión (flechas). Se muestra también cómo las membranas del RE se integran dentro del entramado de membranas de la inclusión (flechas azules). B) MET de una inclusión viral en condiciones no permisivas. La inclusión se localiza muy próxima al núcleo celular (N) y está rodeada de mitocondrias (mi), RE (flechas) y cuerpos lipídicos (asteriscos). La mayoría de las partículas virales presentes en el entramado de membranas de la inclusión están vacías. Barras: 500 nm.

Aunque estaban definidas como estructuras sin membranas, el estudio de microscopía realizado en esta tesis doctoral muestra claramente que las inclusiones de reovirus se forman en plataformas de membranas que contienen las partículas virales en distintos estadios de maduración. Estas membranas que se conectan físicamente con el RER (Figura 59) y que podrían ser un subdominio del compartimento intermedio conocido como ERGIC (*Endoplasmic Reticulum Golgi Intermediate Compartment*) (Fernández de Castro *et al.*, 2014) reclutan mitocondrias, y además, contienen microtúbulos cuando la infección se realiza en condiciones permisivas. Por lo tanto, presentan elementos similares a las factorías de otros virus ARN, como tombusvirus y bunyavirus, estudiados también en esta tesis doctoral.

Discusión

En el presente trabajo se ha estudiado la factoría viral y el CR de distintos virus ARN (tombusvirus, bunyavirus y reovirus), principalmente desde un punto de vista estructural. Para ello se han utilizado técnicas de microscopía óptica confocal y microscopía electrónica 2D y 3D, así como una nueva técnica de mapeo molecular conocida como METTEM. Además, se ha estudiado el papel de ciertas proteínas celulares en la biogénesis de las factorías virales y en el ensamblaje de los CRs.

1. Tombusvirus

1.1. Caracterización del complejo replicativo de tombusvirus

La mayoría de los virus ARN de polaridad positiva y cadena sencilla replican en el citoplasma de células infectadas formando vesículas o esférulas a partir de membranas de orgánulos celulares como mitocondrias, cloroplastos, peroxisomas, endosomas, RE o aparato de Golgi. TBSV es un tombusvirus que infecta distintas especies de plantas. El estudio ultraestructural de tejido de planta infectado por tombusvirus, permitió definir el CR como esférulas de unos 50 nm de diámetro que aparecían en orgánulos modificados, probablemente peroxisomas (Barajas *et al.*, 2009; McCartney *et al.*, 2005). Aunque la planta es el hospedador natural de tombusvirus, la mayoría de estudios e identificación de factores celulares importantes en replicación viral se llevan a cabo en levadura, debido a las múltiples ventajas ya señaladas en la introducción. Por ello, se realizó el análisis del CR de TBSV en células de levadura *S. cerevisiae*, mediante MET, reconstrucción 3D, inmunomarcaje y METTEM.

En células que expresaban los elementos necesarios para la replicación de tombusvirus se observó que se formaban esférulas virales, asociadas a membranas intracelulares. El estudio de la ultraestructura permitió determinar que las esférulas estaban integradas en un sistema complejo de membranas o "compartimento de replicación". Dichas esférulas se localizan en el lumen de este compartimento y están conectadas a la membrana del mismo y al citoplasma a través de un estrechamiento o cuello. El interior de las esférulas virales funcionales está conectado con el citoplasma a través de un poro, así el genoma viral recién sintetizado puede ser liberado y utilizado para el ensamblaje de nuevos virus, mientras en el interior de la esférula se pueden dar nuevas rondas de replicación viral. Además, dicha conexión permite la entrada de componentes necesarios para la replicación. Esto se ha observado en las esférulas formadas por distintos virus como FHV, BMV, virus del Dengue o VHC (Romero-Brey *et al.*, 2012; Welsch *et al.*, 2009; Kopek *et al.*, 2007; Schwartz *et al.*, 2002). Es importante destacar que no se observaron conexiones entre las distintas esférulas, por lo que la unidad básica de replicación viral parece ser la esférula individual integrada en un compartimento más complejo.

Mediante inmunomarcaje con anticuerpos que reconocían la replicasa viral p33, se observó que a menudo las esférulas se concentraban en la periferia celular, cerca de la membrana plasmática, si bien en ocasiones el compartimento se localizó en la zona perinuclear, muy cerca de la membrana nuclear. Además, con METTEM e inmunomarcaje se pudo localizar la replicasa viral p33 no sólo en las esférulas virales donde la proteína es activa, ya que presenta los cofactores y proteínas necesarias para la síntesis del ARN viral, sino también en las membranas que forman el compartimento complejo, definiendo así la localización intracelular general de la proteína. Se ha descrito que las polimerasas virales y cofactores celulares interaccionan con membranas intracelulares formando el orgánulo de replicación y constituyendo los CRs (Miller and Krijnse-Locker, 2008). Con la ayuda de anticuerpos las polimerasas virales se han localizado en el interior de las esférulas. Sin embargo, no se conoce cual es la ruta que siguen las polimerasas desde su síntesis hasta que se integran en las esférulas virales. Con la técnica METTEM se ha podido por primera vez localizar una replicasa viral antes de integrarse en el CR, obteniéndose información importante sobre la dinámica de la proteína dentro de la célula. Probablemente, la proteína se sintetiza a elevada velocidad y se va concentrando en las membranas del compartimento e incorporando a las esférulas virales donde se activa. De esta manera, la biogénesis del CR, y en definitiva, la replicación viral se producirían de forma más eficaz.

Además, se observó un cambio en el patrón de distribución de mitocondrias las cuales, a veces se acumulaban en áreas concretas de la célula, normalmente alrededor del compartimento membranoso con esférulas. Se observaron también conexiones con membranas del RE. El reclutamiento de orgánulos celulares como mitocondrias y RE, ha sido descrito para la mayoría de las factorías virales (de Castro *et al.*, 2013). Las mitocondrias podrían actuar como fuente de energía y factores necesarios para la replicación viral mientras que el RE podría facilitar la síntesis de proteínas. La cercanía de las membranas del RE con el compartimento y los orgánulos de replicación supondría una ventaja para el transporte de proteínas y elementos necesarios para la replicación viral. Por lo tanto, la expresión de proteínas virales implica un reclutamiento y reorganización de membranas intracelulares, formando un sistema complejo de membranas donde se integran las esférulas virales, estructuras donde se lleva a cabo la replicación viral.

Otros virus RNAss (+) como FHV (Schwartz *et al.*, 2002) o BMV (Kopek *et al.*, 2007), también replican su genoma en el interior de esférulas ensambladas a partir de orgánulos celulares como mitocondrias en el caso de FHV o membranas del RE durante la replicación de BMV. Sin embargo, en estos casos no se observó un sistema complejo de membranas, con distintas regiones interconectadas y con esférulas virales. Es importante destacar que no se utilizaron las técnicas de microscopía empleadas en esta tesis doctoral. Como se ha mencionado

anteriormente, las factorías virales son estructuras de gran tamaño, difíciles de estudiar con secciones de 50 nm. Por ello, la obtención de cortes seriados y reconstrucción 3D es una técnica de gran utilidad para la caracterización estructural de las factorías virales. Esta aproximación no sólo permite analizar un mayor volumen de la célula sino que también da información detallada sobre las conexiones entre los distintos elementos que componen la estructura. El modelo 3D obtenido a partir de cortes seriados fue muy útil para tener una visión más completa del compartimento generado por tombusvirus. Se pudo determinar que realmente se trataba de un sistema complejo de membranas, probablemente procedentes de uno o más peroxisomas modificados, formado por distintas regiones con esférulas. Las distintas áreas del compartimento están conectadas por el sistema de membranas. Además, las mitocondrias rodean el compartimento, aunque no se detectaron conexiones claras entre dichas mitocondrias con las esférulas o las membranas del compartimento. Por lo tanto, TBSV forma una factoría en células de levadura muy semejante a la observada en otras infecciones virales. Otros virus también reorganizan las membranas intracelulares generando un sistema complejo donde se integran los CRs. Así, en el caso de coronavirus (SARS), el virus induce la formación de distintas estructuras, como vesículas de una sola membrana, de doble membrana o DMVs y membranas cúbicas. Mediante tomografía electrónica y reconstrucción 3D se determinó que los distintos tipos de estructuras estaban interconectados, formando una red a partir de membranas del RE (Knoops *et al.*, 2008). Otro ejemplo de sistema de membranas continuo es el del virus del Dengue que como en el caso de otros flavivirus forma grupos de vesículas y membranas cúbicas a partir del RE, que están asociadas generando un único compartimento o sistema de membranas (den Boon and Ahlquist, 2010). Por lo tanto, ciertos virus inducen la formación de sistemas complejos de membranas, dando lugar a estructuras altamente especializadas. Esta reorganización de membranas celulares permite que el virus se replique de manera más eficaz, compartimentalizando los elementos que necesita para multiplicarse y quedando protegido de las defensas celulares. Además, en estas áreas conectadas los sitios de replicación y ensamblaje de nuevas partículas virales están muy próximos, permitiendo que el proceso se realice a mayor velocidad.

Con los datos obtenidos, se puede generar un modelo de la factoría de TBSV (Figura 61) en el cual la replicasa viral p33 se concentra en las membranas de un compartimento u orgánulo modificado, el cual, presenta distintas áreas o regiones interconectadas. Cada una de estas zonas posee vesículas o esférulas virales, donde la replicasa es activa y se lleva a cabo la replicación viral. Estas esférulas están conectadas a la membrana del compartimento y al citoplasma a través del cuello. Además, orgánulos celulares como mitocondrias y RE rodean al sistema de membranas, aportando energía o elementos necesarios para la replicación viral.

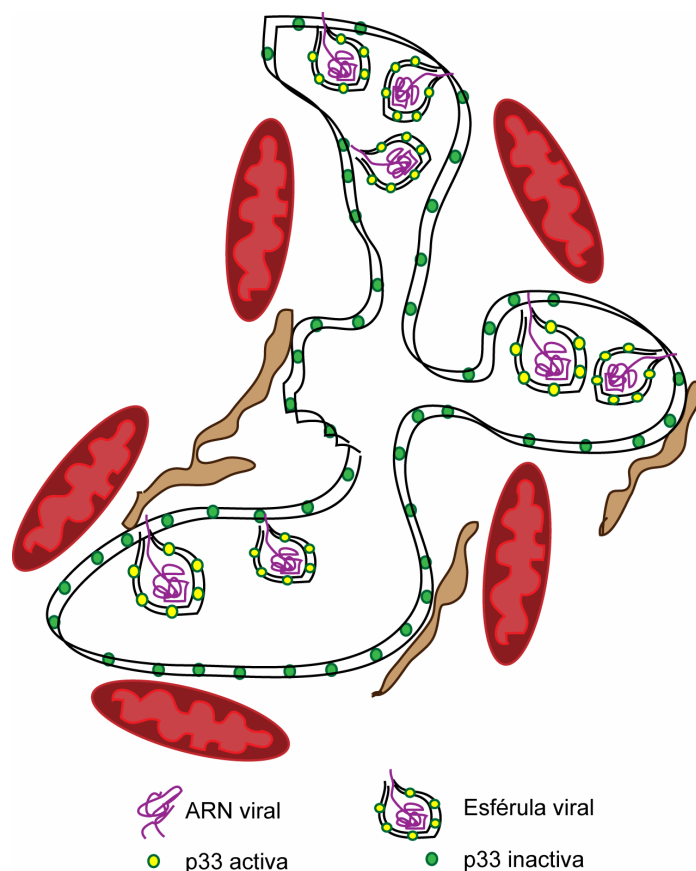


Figura 61. Modelo de la factoría de tombusvirus

Tombusvirus induce la formación de esférulas o vesículas a partir de membranas del peroxisoma y del RE. La replicasa viral p33 se distribuye en las esférulas virales, donde es activa y lleva a cabo la replicación viral; pero también se localiza en las membranas intracelulares que definen el compartimento u orgánulo modificado. Las esférulas funcionales, donde se lleva a cabo la replicación viral, conectan con el citoplasma a través de un poro, permitiendo la salida del ARN recién sintetizado. Mitocondrias (rojo) y RE (marrón) rodean el orgánulo modificado aportando elementos clave para la replicación viral.

Una vez caracterizados el CR y la factoría de tombusvirus en células de levadura, se estudió el posible papel de ciertas proteínas celulares (ESCRT y Pah1) en el ensamblaje del CR. Son proteínas cuya eliminación influye en la replicación de tombusvirus, y que por tanto, podrían influir en la formación de las esférulas virales.

1.2. La proteína Vps4 es requerida para el correcto ensamblaje del CR de tombusvirus en levaduras

En la formación del CR de tombusvirus intervienen proteínas o factores celulares como la chaperona Hsp70 o el factor de elongación eEF1A, tanto en células de planta como de levadura (Nagy *et al.*, 2012; Barajas and Nagy, 2010; Li *et al.*, 2009). Durante la replicación de TBSV se reclutan las proteínas ESCRT, comenzando por la unión de Vps23 y Bro1 (complejo ESCRT-I), lo cual provoca el reclutamiento de los componentes del complejo de ESCRT-III y de Vps4 (ATPasa de tipo A) (Barajas and Nagy, 2010; Barajas *et al.*, 2009) (explicación y esquema del modelo de reclutamiento de las proteínas ESCRT en Introducción). Además, la delección de las

proteínas ESCRT en levaduras reduce considerablemente la acumulación de ARN de TBSV (Barajas *et al.*, 2009). Según el modelo propuesto las proteínas ESCRT estarían implicadas en la invaginación de membranas que lleva a la formación de las esférulas virales en las que se produce la replicación de tombusvirus. Las proteínas ESCRT median la formación de vesículas en la ruta multivesicular, la separación de las células hijas por citocinesis, y la gemación o *budding* de ciertos retrovirus como el VIH. Se esperaría que el reclutamiento de las proteínas ESCRT a la membrana del peroxisoma durante la infección por TBSV terminase con la escisión de las esférulas por el cuello, como ocurre durante la formación de los cuerpos multivesiculares o la gemación de los viriones de VIH (Hurley *et al.*, 2010; Hurley and Hanson, 2010; Wollert and Hurley, 2010). Sin embargo, la escisión de las vesículas generando esférulas cerradas en el lumen del peroxisoma en una etapa temprana, supondría un problema para la replicación de tombusvirus. Esto es debido a que las vesículas cerradas en el lumen del compartimento no tendrían acceso a los ribonucleótidos y componentes necesarios para la síntesis del ARN viral, así como dificultades para liberar el ARN recién sintetizado al citoplasma. Dicha liberación es necesaria para que se puedan dar nuevas rondas de replicación en la esférula viral, para el movimiento del ARN viral recién sintetizado a otras células o para su encapsidación. Por lo tanto, para la replicación de tombusvirus tiene que haber un mecanismo a través del cual se estabilice el cuello de la esférula, generando vesículas abiertas al citosol como las mostradas en el modelo de la Figura 61.

La cuestión es cómo el cuello de las esférulas puede ser estabilizado, previniendo así la formación de vesículas cerradas en el lumen del compartimento. Se demostró que la proteína ESCRT Vps4 se localiza muy próxima al dsRNA, intermediario y marcador de replicación viral. La producción de dsRNA tiene lugar después del ensamblaje del CR, por lo tanto, Vps4 es un componente estable del CR ensamblado como se demostró también por técnicas bioquímicas (Barajas *et al.*, 2014). Además, Vps4 y el dsRNA se encontraron en el interior del mismo compartimento, en zonas con vesículas y membranas. Con la técnica METTEM se pudo observar que la proteína Vps4 estaba presente en el compartimento definido por los clusters de la replicasa viral (p33-MT), muy cerca de la señal correspondiente a la replicación viral. En base a estos resultados, Vps4 es reclutada e incorporada al CR como un componente permanente del complejo.

Además, en células de levadura que carecen de la proteína Vps4 ($\Delta vps4$) no se formaron esférulas o vesículas completas. Se producía la deformación de la membrana, pero parecía que faltaba el componente que cierra y estabiliza el cuello de la esférula, generándose vesículas abiertas. Sin embargo, dichas estructuras sí son funcionales o al menos parcialmente, ya que en las levaduras $\Delta vps4$ se detectó replicación viral, aunque inferior con respecto al control sin

deleción de la proteína ESCRT (Barajas *et al.*, 2014). Por lo tanto, Vps4 es necesaria para la formación de las esférulas típicas de tombusvirus con el cuello o constricción de las vesículas que genera el poro a través del cual se comunican con el citosol. Además, esta hipótesis se verificó también utilizando METTEM, se pudo apreciar como en la levadura control las moléculas de replicasa viral definían esférulas de 50-60 nm de diámetro, en las cuales se podía apreciar el cuello de la vesícula. También se observó la conexión de la vesícula con la membrana del compartimento y con el citoplasma. Sin embargo, en levaduras *Δvps4* no se detectaron moléculas de replicasa en vesículas completas, sino en estructuras alargadas y abiertas, que se correspondían con las vesículas incompletas observadas mediante análisis ultraestructural en MET. La proteína Vps4 se encuentra en el citoplasma en estado inactivo, pero puede ser reclutada a membranas, a sitios de acción donde une ATP y forma complejos de mayor orden (Guizetti and Gerlich, 2012). Puede asociarse formando hexámeros, los cuales presentan forma de anillo y podrían constituir el poro presente en el cuello de la esférula y que comunica el interior de la vesícula con el citoplasma. La capacidad de la proteína de asociarse formando estructuras cilíndricas en forma de poro, junto con los resultados obtenidos, apoya la hipótesis de que Vps4 podría ser la proteína que constituye el poro o cuello de la esférula de tombusvirus.

Con los datos obtenidos, se puede afirmar que la proteína ESCRT Vps4 es un componente del CR de tombusvirus. Además, es necesaria para la formación y ensamblaje de las esférulas virales. Se dispondría en forma de anillo en el cuello de la vesícula, estabilizando la estructura y manteniendo las esférulas durante la replicación. En ausencia de dicha proteína, se reduce considerablemente la replicación viral y las esférulas aparecen como vesículas incompletas. La estabilización de Vps4 del cuello de la vesícula evitaría la escisión y formación de esférulas cerradas y no funcionales en el lumen del compartimento. Además, Vps4 podría desempeñar otras funciones como controlar, utilizando su actividad ATPasa de tipo A, la salida del ARN viral recién sintetizado. La reducción de la replicación viral observada en las cepas *Δvps4*, podría deberse a que el ARN viral está más expuesto en las vesículas incompletas, pudiendo ser degradado más fácilmente por las ARNasas del citosol. Por lo tanto, otra posible función de Vps4 sería regular la entrada de componentes al interior de la esférula y proteger el ARN viral de la degradación.

En la Figura 62 se muestra un modelo de la función de Vps4 en el ensamblaje y mantenimiento del CR de tombusvirus (Barajas *et al.*, 2014). En el modelo, Vps4 es un componente permanente del CR que estabiliza el cuello de la esférula generando el poro que permite el intercambio de componentes con el citoplasma. Además, se representan otras proteínas ESCRT que también están implicadas en el ensamblaje del complejo de replicación.

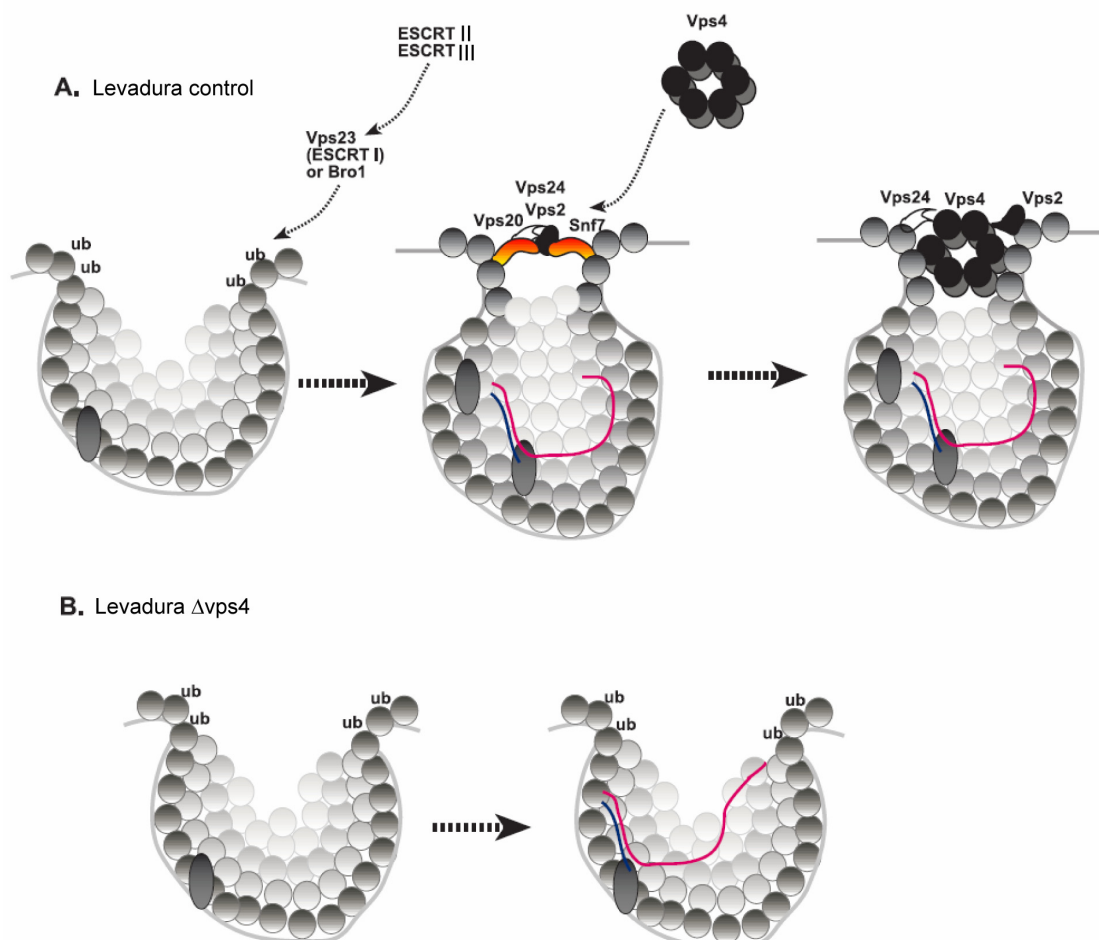


Figura 62. Modelo de la función de Vps4 durante la replicación de tombusvirus en levaduras control y en la cepa $\Delta vps4$

A) En levaduras control se produce la ubiquitinación de la replicasa viral p33 y el reclutamiento de proteínas ESCRT a la membrana del peroxisoma. La invaginación y formación de las vesículas va acompañada de la estabilización, por parte de Vps4, del cuello de la esférula. Vps4 se dispone en forma de anillo, formando un poro a través del cual se comunica el interior de la vesícula con el citosol. B) En levaduras $\Delta vps4$, la ausencia de la proteína ESCRT afecta a la formación de las esférulas, las cuales han perdido la estructura del cuello, generándose vesículas incompletas en las que el ARN viral está expuesto al citosol. Modificado de Barajas *et al.*, 2014.

Las proteínas ESCRT Snf7, Vps23 y Vps24 también son necesarias para la formación del CR de tombusvirus. El reclutamiento de dichas proteínas durante la replicación de TBSV es necesario para la invaginación de la membrana del peroxisoma, que da lugar a las esférulas virales. En levaduras que carecen de dichas proteínas ESCRT ($\Delta snf7$, $\Delta vps23$ y $\Delta vps24$) se ve afectada la replicación y producción de proteínas virales; así como, la formación de las esférulas o CRs. En el caso de levaduras $\Delta vps24$ el fenotipo es muy semejante al que muestra la cepa $\Delta vps4$; es decir, las esférulas se mostraron como vesículas incompletas o abiertas, donde no se

apreciaba el cuello. En levaduras *Δsnf7* y *Δvps23* se generaron cúmulos de membranas muy ricas en lípidos, que podrían corresponder con una nueva estructura para la replicación viral, ante la falta de las típicas esférulas. Mediante METTEM se observó que las moléculas de replicasa viral tampoco definían estructuras circulares, sino que las moléculas estaban más dispersas y dispuestas en membranas que no formaban vesículas. Aunque los datos apuntan a Vps4 como la estructura que genera el cuello de la esférula, implicada en formación y mantenimiento de estas vesículas, nuestros resultados indican que otras proteínas ESCRT también son necesarias para la formación del CR. La alteración en la ruta multivesicular parece afectar a la biogénesis de las vesículas y también a la replicación viral, lo que puede ser consecuencia de la pérdida de la estructura de las esférulas. El virus encuentra la forma de replicarse en asociación a membranas, donde se inserta la replicasa viral, pero lo hace de forma menos efectiva, o bien, el ARN recién sintetizado está menos protegido y es degradado. Por lo tanto, los complejos ESCRT-I y ESCRT-III son necesarios para el ensamblaje óptimo del CR de tombusvirus desde un punto de vista estructural, generando las esférulas o vesículas virales.

Por otro lado, hasta la fecha, el reclutamiento de las proteínas ESCRT durante la replicación viral sólo se ha demostrado para tombusvirus, mientras que otros virus utilizan la maquinaria ESCRT en otras etapas del ciclo vital. Por ejemplo, el VIH utiliza las proteínas ESCRT para salir de las células mediante gemación (Hurley *et al.*, 2010). Otros virus con envuelta pertenecientes a varias familias también reclutan la maquinaria de las proteínas ESCRT a la membrana plasmática, donde son utilizadas para la fusión de las partículas virales con la membrana plasmática y salida al exterior (Perlman and Resh, 2006; Morita and Sundquist, 2004). El virus de la hepatitis A es un picornavirus con envuelta, adquirida con la participación de las proteínas ESCRT a partir de la membrana de los hepatocitos infectados (Feng *et al.*, 2013).

Ciertos factores celulares, por tanto, facilitan el ensamblaje de la estructura del CR viral, induciendo la curvatura de la membrana y actuando como componentes del CR. Las proteínas ESCRT son un claro ejemplo de factor celular clave en formación y ensamblaje del CR de tombusvirus. Dichas proteínas podrían desempeñar un papel semejante durante la replicación de otros virus ssRNA (+) que también forman esférulas o vesículas mediante deformación de la membrana de orgánulos celulares. Sin embargo, no todos los factores celulares facilitan la replicación viral. Así, la eliminación de la proteína Pah1, implicada en el metabolismo lipídico, genera un incremento en la replicación de tombusvirus, lo cual indica que esta proteína es un regulador negativo de la replicación viral. Esta circunstancia proporcionó condiciones óptimas para el estudio estructural del CR de TBSV.

1.3. El CR de tombusvirus en células de levadura que carecen de la proteína Pah1

La mayoría de los virus utilizan los lípidos de la célula huésped en distintas etapas del ciclo vital, facilitando que los procesos de entrada, replicación y salida del virus sean eficientes. En concreto, la replicación de numerosos virus ssRNA (+) requiere síntesis de lípidos y modificación del metabolismo lipídico. Ciertos picornavirus, y otros virus ssRNA (+) requieren síntesis de fosfolípidos y/o esteroides para replicarse de manera efectiva (Sharma *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2010; Cherry *et al.*, 2006; Carette *et al.*, 2000; Perez *et al.*, 1991; Guinea and Carrasco, 1990). En el caso del BMV, su replicación requiere de la enzima OLE1, que cataliza la desaturación de ácidos grasos promoviendo la fluidez de la membrana (Lee *et al.*, 2001). Además, BMV utiliza la proteína de unión a acil coenzima A (ACBP), implicada en la síntesis de lípidos, para replicarse de manera eficiente (Zhang *et al.*, 2012). Se ha demostrado que la morfología de esférulas virales se ve afectada en células que carecen de la proteína ACBP. Por lo tanto, se requieren enzimas implicadas en la síntesis de lípidos para modificar la composición y curvatura de las membranas, además de las proteínas o factores celulares que inducen de forma directa la deformación o curvatura de dichas membranas. Ciertas proteínas virales también juegan un papel importante en cambios en el metabolismo de lípidos de incidencia directa en la formación del CR. Por ejemplo, durante la infección por VHC, aunque la proteína viral NS4B dirija la remodelación de membranas, la proteína viral no estructural NS5A influye en el proceso a través de la regulación de la fosfatidil inositol 4 quinasa (PI4-quinasa) (Reiss *et al.*, 2011). De forma similar, la modulación de síntesis de ácidos grasos por la proteína NS3 del virus del Dengue probablemente regule a su vez la capacidad de NS4A para dirigir el ensamblaje del CR. La formación del CR del BMV requiere de la interacción de la proteína viral 1a con las proteínas celulares homólogas al retículo para promover la formación de las esférulas virales (Diaz *et al.*, 2010).

En el laboratorio del Dr. Peter Nagy observaron que la eliminación de la proteína Pah1, fosfatasa implicada en el metabolismo y síntesis de lípidos, causa un incremento considerable de la replicación viral y de la acumulación de la replicasa viral p33. Por ello, las levaduras sin la proteína Pah1 (*Δpah1*) facilitaron el estudio y caracterización del CR de tombusvirus. En levaduras la delección del gen que codifica para dicha proteína provoca una gran proliferación y expansión de la membrana nuclear y del RE; además el núcleo aparece segmentado en muchas de las células (Siniosoglou, 2009). Mediante el método METTEM se pudo observar el compartimento donde se acumulan las moléculas de replicasa viral. En estas células el orgánulo o compartimento de replicación ocupa un área extensa dentro de la célula, y la replicasa viral se localizó en membranas del RE que están, a su vez, asociadas con el compartimento. El estudio de volúmenes mayores de la célula de levadura, gracias a los cortes seriados y reconstrucción 3D,

permitió verificar que en células *Apah1* existe un orgánulo modificado con esférulas virales en su interior y que está asociado a membranas del RE. Además, la morfología y el tamaño de las esférulas no se vieron alterados por el cambio en la composición lipídica de las membranas. Las dos aproximaciones de MET, reconstrucciones 3D de cortes seriados y METTEM, están definiendo el mismo compartimento generado por la expresión de los elementos del virus. Mediante inmunomarcaje se detectó replicación viral en las esférulas virales presentes en el interior del compartimento, y también aunque aparentemente en menor medida, en las membranas del RE asociado al compartimento. La mayor replicación viral observada en las cepas *Apah1* podría deberse a que el virus utiliza la expansión y modificación de las membranas del RE para replicarse de forma más efectiva. La eliminación de la proteína Pah1 genera una gran superficie para la síntesis del genoma viral, permitiendo un mayor número de rondas de replicación en menos tiempo. Además, podría implicar la obtención de membranas con composición lipídica óptima para la biogénesis y ensamblaje del CR de tombusvirus.

Existen otros virus que modifican la composición lipídica de las membranas para multiplicarse a mayor velocidad. Así, los flavivirus activan la síntesis de lípidos para establecer los sitios de replicación viral. WNV recluta las enzimas implicadas en la síntesis de colesterol a los sitios de replicación viral para replicarse de forma efectiva y también reduce los niveles de colesterol en la membrana plasmática para anular la respuesta antiviral (Mackenzie *et al.*, 2007). De forma similar, la replicación del virus del Dengue requiere biosíntesis y transporte de colesterol; además el virus manipula la síntesis de ácidos grasos (Poh *et al.*, 2012; Rothwell *et al.*, 2009). La proteína viral NS3 del virus del Dengue interacciona con la ácido graso sintasa (FASN), relocalizando la enzima a los sitios de replicación viral y estimulando su actividad (Heaton *et al.*, 2010). Además, durante la infección por WNV, también se produce una relocalización de la enzima FASN a los sitios de replicación viral (Martin-Acebes *et al.*, 2011). Como consecuencia de la manipulación de FASN, el virus altera la composición lipídica para la formación del CR. La biosíntesis de lípidos se relaciona con la modificación postraduccional de factores virales y celulares durante la infección viral (Majeau *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2006), así como con la adquisición de la envuelta en algunos virus. Por lo tanto, muchas de las enzimas, que como Pah1 están relacionadas con el metabolismo de lípidos y la composición de las membranas, desempeñan una función clave en el ensamblaje del CR de distintos tipos de virus.

El incremento en replicación viral y síntesis de proteínas virales observado en levaduras *Apah1* podría ser debido no sólo a la presencia de una superficie mayor para el ensamblaje del CR viral, sino también a la asociación que existe entre el compartimento u orgánulo modificado con el RE, generando una red o plataforma altamente especializada. De esta manera, las distintas etapas del ciclo vital se compartimentalizan en un área concreta optimizando el proceso. La red o

plataforma formada durante la replicación de TBSV en levaduras *Δpahl* recuerda a la generada por otros virus como flavivirus, coronavirus o arterivirus. En estos casos, los virus ensamblan distintos tipos de vesículas a partir del RE, dando lugar a una plataforma constituida por diferentes tipos de estructuras interconectadas. El alto grado de especialización de la plataforma de RE permitiría llevar a cabo distintas funciones como replicación viral, almacenamiento del genoma viral de nueva síntesis o ensamblaje de nuevos virus. También facilitaría el transporte de componentes entre las distintas regiones del orgánulo de replicación. Por lo tanto, los virus requieren cierta composición de las membranas donde van a ensamblar el CR, y los lípidos son un componente clave, cuya modificación repercute directamente en las principales características de las membranas intracelulares.

En las levaduras *Δpahl* el ensamblaje del CR se produce de forma más rápida y efectiva que en levaduras control, detectándose gran cantidad de moléculas de replicasa viral mediante METTEM y replicación viral en un elevado número de células. Por ello, se consideró interesante realizar un estudio de tomografía electrónica para visualizar cómo se distribuyen las moléculas de replicasa viral en 3D con alta resolución. En el modelo 3D se pudo apreciar que existían distintos niveles de agregación de las moléculas de replicasa viral, dependiendo de la localización en distintos dominios del compartimento de replicación. Es probable que los distintos niveles de empaquetamiento se correspondan con el estado de actividad de la proteína. Se detectaron zonas en las que las moléculas de p33 estaban muy agregadas coincidiendo con regiones de curvatura de la membrana, y que corresponden muy probablemente con las esférulas virales. En resultados anteriores se mostró que la replicasa está activa en estas esférulas, por lo que el alto grado de empaquetamiento mostrado en la zona de curvatura de la membrana podría corresponder a un estado activo de la proteína. En el caso de las levaduras *Δpahl* la replicación viral también se da en zonas discretas de las membranas del RE, en las que el nivel de empaquetamiento de las moléculas de replicasa viral sería probablemente similar al existente en las esférulas. Sin embargo, se encontraron áreas grandes definidas por moléculas de p33 poco agregadas, con un patrón difuso. Muy probablemente, dichas regiones extensas correspondan con los sitios donde la proteína no está activa, coincidiendo con los resultados de los marcajes con anti-dsRNA. Los distintos grados de empaquetamiento encontrados para la replicasa de tombusvirus es un ejemplo de cómo la distribución y organización de las moléculas podría influir en el estado de actividad de la proteína.

El mayor estado de agregación de las moléculas de replicasa viral en las regiones donde la proteína es activa coincide con datos obtenidos anteriormente para otros virus. Así, Kirkegaard y colaboradores (Lyle *et al.*, 2002) observaron en estudios *in vitro* que la polimerasa de poliovirus agrega dando lugar a matrices oligoméricas en las que las moléculas de polimerasa

podrían desempeñar tanto funciones catalíticas como estructurales (Spagnolo *et al.*, 2010). La estructura de la polimerasa de poliovirus es muy semejante a la encontrada en células infectadas por coxsackievirus, en las cuales, las polimerasas forman estructuras altamente organizadas (Kemball *et al.*, 2010) (ver Figura 4 en Introducción). Durante la infección por VRUB las moléculas de replicasa se concentraron en las CPVs, donde la proteína es activa, y donde, con la técnica METTEM, se pudo observar que las moléculas forman complejos altamente empaquetados (Risco *et al.*, 2012). Además, en el CR de VBUN la polimerasa se organizaría de forma similar (resultados mostrados en esta tesis doctoral y discutidos más adelante). Parece que la replicasa de tombusvirus también se asocia formando agregados altamente empaquetados y que podría coincidir, al igual que para otros virus, con un estado activo de la proteína.

La utilización de un sistema como las levaduras *Δpah1*, donde la replicación de TBSV es considerablemente superior a la que presentan las levaduras control permitió obtener información muy relevante sobre la biogénesis del CR de tombusvirus y sobre la organización en 3D de las moléculas de replicasa viral. Durante la búsqueda de factores que influyen en la replicación de tombusvirus, en el laboratorio del Dr. Peter Nagy también observaron un incremento en la replicación cuando se afectaba el citoesqueleto de actina, tanto en plantas, hospedador natural de tombusvirus, como en levaduras. Por ello, fue interesante estudiar también la formación del CR en estas condiciones.

1.4. Influencia del citoesqueleto en la replicación de tombusvirus

El citoesqueleto compuesto por filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios, regula importantes procesos en la célula, como por ejemplo el transporte intracelular. Frecuentemente, la actina y los microtúbulos están implicados en distintas etapas del ciclo vital de los virus. Durante la entrada del virus, endocitosis, entrada en el núcleo, transcripción, replicación, ensamblaje viral, transporte de los nuevos viriones hasta membrana plasmática y salida mediante exocitosis, los virus modifican distintas rutas de señalización celular para modificar el citoesqueleto, y utilizarlo para su propagación.

Algunos virus utilizan el citoesqueleto para la replicación de sus genomas. Por ejemplo, ciertos virus utilizan los filamentos de actina para transportar proteínas necesarias para la replicación hasta la factoría viral. La actina nuclear se ha relacionado con procesos como la transcripción, *splicing*, exportación de ARNm, remodelación de la cromatina, y formación del nucleoesqueleto y de la lámina nuclear (Pederson and Aebi, 2005; Bettinger *et al.*, 2004). El ARNm del virus vaccinia colocaliza con microtúbulos, los cuales son necesarios para la expresión génica (Schramm and Locker, 2005; Mallardo *et al.*, 2001). El genoma ARN del virus

parainfluenza es replicado y transcrito en asociación con filamentos de actina, y la despolimerización de actina inhibe la síntesis de ARN viral (Gupta *et al.*, 1998). En el caso del virus influenza, los ARNm sintetizados están asociados con la proteína de la nucleocápsida, la cual se une a los filamentos de actina que regulan la entrada y salida del núcleo, y retienen el complejo de ribonucleoproteínas en el citosol para que la transcripción viral sea eficiente (Portela and Digard, 2002). Durante la infección por el potivirus *Turnip mosaic virus* (TuMV), el virus induce la formación de vesículas en la periferia celular que son transportadas para formar una estructura o factoría globular y perinuclear (Grangeon *et al.*, 2012). Dicho transporte intracelular probablemente está mediado por la reorganización del citoesqueleto de actina (Hoffmann and Nebenfuhr, 2004). Diversos estudios indican que el citoesqueleto de actina desempeñaría un papel clave en el transporte de las estructuras generadas por los virus (Schoelz *et al.*, 2011; Harries *et al.*, 2010).

La actina y los microtúbulos no sólo pueden anclar el complejo de transcripción, también secuestran e inactivan factores reguladores. Así la profilina, proteína de unión a la actina, actúa como factor regulador estimulando la transcripción del virus respiratorio sincitial humano, demostrándose que este proceso es dependiente de actina en estudios *in vitro* (Burke *et al.*, 2000). La transcripción del virus Sendai está promovida por la unión de tubulina a la proteína de la matriz, que actúa como regulador negativo de la transcripción viral (Ogino *et al.*, 2003). Por lo tanto, actina y tubulina desempeñan funciones reguladoras, además de actuar como proteínas estructurales y mediar procesos de transporte.

Estos datos demuestran que la actina desempeña importantes funciones durante el ciclo vital de diferentes tipos de virus. En estos casos la eliminación de la proteína afectaría, considerablemente a la replicación y propagación del virus. Sin embargo, la replicación de TBSV se ve favorecida en ausencia de actina. En células de planta, donde se había inhibido la polimerización de filamentos de actina con citocalasina-D, el estudio de MET mostró un incremento de la replicación viral así como en el ensamblaje de esférulas virales y acumulación de virus. Por lo tanto, se encontró un mayor número de células de planta con esférulas que presentaron el mismo tamaño, alrededor de 50 nm, y morfología que en células de planta donde la actina no había sido inhibida. Dichas esférulas o vesículas se localizaron en el interior de un compartimento u orgánulo modificado, formándose probablemente mediante invaginación de la membrana del peroxisoma. Además, con MET se detectaron grandes acumulaciones de virus en forma de matriz o *array*, que ocupaban un gran volumen en la planta. Parece que tombusvirus se multiplica de manera más eficaz cuando se altera el citoesqueleto de actina. Es posible que la remodelación de membranas necesaria para la formación de esférulas se vea facilitada al destruir los filamentos de actina. Por otro lado, la desorganización del citoesqueleto podría generar

espacio disponible para la acumulación de mayor cantidad de virus. Aunque como se ha mencionado anteriormente, la actina además de desempeñar una función estructural anclando el CR, también puede actuar como factor de regulación durante las infecciones virales. Así, la actina y proteínas asociadas podrían estar inhibiendo factores que facilitan la replicación o estimulando otros que dificultan la multiplicación del virus, constituyendo un regulador negativo de la replicación de tombusvirus. Esta posible función de la actina explicaría que su eliminación favorezca la replicación y propagación de TBSV.

Por otro lado, se estudió mediante MET el efecto que tiene la eliminación de la actina en la formación de esférulas virales en levaduras *S. cerevisiae* que expresan los elementos necesarios para la replicación de TBSV. En levaduras el citoesqueleto de actina es clave durante los procesos de endocitosis, citocinesis, determinación de la polaridad celular y durante la morfogénesis (Moseley and Goode, 2006). Se verificó que al igual que en células de planta, en levaduras la alteración del citoesqueleto de actina se relaciona con un incremento en la replicación de tombusvirus. Se observaron acumulaciones de membranas en las zonas de replicación viral, localizándose membranas del RE asociadas al compartimento que contenía las esférulas. Parece que en levaduras la inhibición de actina facilita el reclutamiento y reorganización de membranas intracelulares, generando estructuras formadas por grandes acúmulos de membranas, esférulas y RE, donde la replicación viral es más efectiva. Por lo tanto, en los dos sistemas estudiados la actina parece dificultar la replicación de tombusvirus, diferencia importante con otros virus en los que el citoesqueleto de actina constituye un elemento clave para multiplicarse. En ausencia de dicha proteína se facilita el ensamblaje del CR de TBSV, obteniéndose mayor número de esférulas virales en plantas o grandes acumulaciones de membranas y RE en levaduras, lo que se traduce en un incremento de la replicación de tombusvirus en estas condiciones.

En resumen, los datos obtenidos en este trabajo mostraron que la expresión de los elementos necesarios para la replicación de tombusvirus en levaduras implica la reorganización de membranas intracelulares, generando un compartimento donde se integran las esférulas virales o CR. La replicasa viral p33 se inserta en las membranas del compartimento y en las esférulas virales donde se lleva a cabo la replicación viral. Orgánulos celulares como las mitocondrias y el RE podrían aportar factores y elementos necesarios para la multiplicación del virus. Además, se han investigado factores celulares claves para la replicación, como la proteína ESCRT Vps4. Se demostró que dicha proteína es un componente estable del CR de TBSV, esencial para la formación y mantenimiento de las esférulas virales. Por otro lado, la eliminación de ciertas proteínas celulares se traduce en un incremento de la replicación de tombusvirus. Así, la ausencia de la proteína Pah1 implica expansión de las membranas del RE que son utilizadas

por el virus para fabricar una plataforma de membranas en la que consigue replicarse de forma más efectiva. La inhibición de la actina también facilita el ensamblaje del CR y la replicación viral, tanto en plantas como en levaduras. Una característica importante de la replicasa p33 de tombusvirus es su capacidad de agregarse formando complejos altamente empaquetados, y que parecen corresponder con el estado más activo de la proteína. Sería interesante localizar la replicasa viral p33 con METTEM en células de planta, ya que aunque el trabajo con levaduras tenga numerosas ventajas para la identificación de factores importantes en replicación, la planta es el hospedador natural de TBSV y se podría obtener información muy relevante sobre la localización de la proteína en membranas intracelulares. También se podría estudiar el CR de tombusvirus con técnicas de crio-microscopía, como por ejemplo congelación a alta presión y crio-sustitución, para obtener una mayor preservación de la muestra y de las estructuras inducidas por el virus.

2. Bunyavirus

2.1. Ensamblaje del CR de virus Bunyamwera en células de mamífero

Los bunyavirus ensamblan factorías de gran tamaño alrededor del aparato de Golgi, donde el virus ensambla sus CRs y las partículas virales se forman y maduran (Fontana *et al.*, 2008; Novoa *et al.*, 2005a; Salanueva *et al.*, 2003). La infección por VBUN en células de mamífero se caracteriza por la alteración del citoesqueleto de actina y por el reclutamiento de orgánulos celulares como mitocondrias y RE. El CR ensambla en el aparato de Golgi generando estructuras tubulares que presentan una parte globular o esférula de unos 100 nm de diámetro (Fontana *et al.*, 2008; Novoa *et al.*, 2005a; Salanueva *et al.*, 2003). En células Vero al principio de la infección viral tiene lugar la fragmentación del Golgi, generándose sáculos de tamaño más pequeño (Salanueva *et al.*, 2003). Sin embargo, estos fragmentos de Golgi deben ser funcionales ya que en estas condiciones se liberan virus infectivos al medio. En trabajos previos del laboratorio se había estudiado con detalle la factoría del VBUN formada en células de hámster BHK-21, en las cuales no se produce la fragmentación del Golgi observada en las células de primate. Por ello, en esta tesis doctoral se ha profundizado en el estudio de la factoría del VBUN en células Vero, para verificar si los fragmentos de Golgi generados durante la infección poseen los mismos elementos y contactos entre ellos que la factoría de BHK-21, lo que explicaría su funcionalidad.

En este trabajo se observó que en una etapa temprana de la infección viral en células Vero tiene lugar el reclutamiento del RE, el cual se dispone rodeando a la factoría. Además, la alteración del citoesqueleto conlleva a la pérdida de los filamentos de actina en el citoplasma, lo

que se hace notable en etapas tardías de la infección viral. El virus altera la distribución normal del RE y del citoesqueleto porque utiliza estos elementos celulares para la formación de la factoría y para replicarse. Fontana y colaboradores detectaron actina, entre otras proteínas celulares y virales, en el interior de los tubos virales y de los virus inmaduros, lo cual sugiere un papel importante de esta proteína en el ensamblaje del CR de VBUN (Fontana *et al.*, 2008). Además, los resultados obtenidos con el uso de drogas que desorganizan los filamentos de actina, como el jasplakinólido, fueron claves para demostrar la participación de la proteína en la morfogénesis del virus. Así, el uso de dicha droga afectaba a la formación de los tubos virales y de las nuevas partículas virales (Fontana *et al.*, 2008). Muchos virus utilizan la actina para su propio beneficio, por lo tanto, no es de extrañar que la infección por VBUN altere la organización de los filamentos de actina. Como se ha comentado anteriormente ciertos virus emplean el citoesqueleto de actina para el transporte intracelular, mientras que otros lo desorganizan para facilitar la infección (Cudmore *et al.*, 1997). Por otro lado, la actina es un componente estructural del virus del herpes (Grunewald *et al.*, 2003), y se ha descrito su participación en la organización de los sitios de acumulación de ARNm y en la síntesis de las proteínas estructurales del VIH (Kimura *et al.*, 1996).

El estudio de la factoría del VBUN en cortes seriados y reconstrucción 3D permitió observar que en células Vero también se produce el reclutamiento de mitocondrias y RE alrededor del Golgi. Aunque se produce una fragmentación generalizada del Golgi las factorías del VBUN presentan los mismos elementos que en células BHK-21. En el citoplasma de células Vero se observaron múltiples mini-factorías funcionales, formadas por fragmentos de Golgi rodeados de mitocondrias y RE. Además, el modelo 3D permitió observar los contactos que se establecen entre los distintos elementos de la factoría. Así, los CRs y los virus inmaduros se asocian frecuentemente con el RE y con las mitocondrias. Los contactos podrían facilitar el transporte de proteínas y factores necesarios para replicación y ensamblaje viral. En el caso de las mitocondrias podrían actuar como fuente de energía y proporcionar factores utilizados por el virus en la factoría. Los contactos entre los tubos virales y los virus inmaduros con el RE no se habían observado en estudios previos con células BHK-21. Estos datos apuntan a que los tubos virales podrían actuar como elemento de unión física entre los componentes de la factoría. Es posible que el RE también sea importante en morfogénesis viral, aportando proteínas necesarias para la maduración.

Por otro lado, se estudió la factoría viral y la distribución de la polimerasa viral L en células transfectadas que expresaban la polimerasa L unida al marcador MT y la nucleoproteína N. Las dos proteínas virales son suficientes para ensamblar el CR funcional en las membranas del aparato de Golgi, detectándose replicación viral en zona perinuclear de las células

transfectadas. En estas condiciones, también se induce la formación de la factoría viral constituida por el aparato de Golgi rodeado de mitocondrias y RER. Probablemente, la polimerasa viral L sea suficiente para inducir el reclutamiento de orgánulos celulares y ensamblaje de la factoría viral. Esto es semejante a lo que ocurre en otras las infecciones virales, donde las polimerasas interaccionan con factores celulares e inducen el reclutamiento de orgánulos. Por lo tanto, la factoría generada en células transfectadas presenta la misma estructura y componentes que la formada durante la infección por VBUN. Los resultados obtenidos demuestran que las proteínas virales L y N son suficientes para inducir la formación de pseudo-partículas virales. Es sorprendente que en ausencia de las glicoproteínas del virus se complete el *budding* dando lugar a partículas esféricas o VLPs (*virus-like particles*), aparentemente idénticas a los virus intracelulares observados durante la infección por VBUN. Sin embargo, no se observaron pseudo-partículas virales en el exterior de las células ni se detectaron partículas infectivas con los ensayos de titulación. Por lo tanto, aunque se completa el *budding*, las partículas observadas constituyen virus defectivos incapaces de salir de las células y sin capacidad infectiva. Estos datos demuestran que el resto de las proteínas virales no son necesarias para ensamblar las VLPs. Las pseudo-partículas encontradas no son infectivas debido a la falta de las glicoproteínas virales, necesarias para la formación de virus intracelulares maduros o de tipo II, que se produce por adición de azúcares a dichas glicoproteínas. Además, estas proteínas virales son necesarias para la entrada en la célula por interacción con los receptores de la superficie celular. Por otro lado, la proteína NSm es un factor importante para la morfogénesis viral, requerida también para la formación de virus maduros e infectivos, aunque no sea necesaria para el ensamblaje de las partículas virales, como se ha visto anteriormente. Por lo tanto, la concentración del ARN sintetizado junto con la nucleoproteína N (RNPs) en las cisternas del Golgi, es capaz de inducir el ensamblaje de partículas virales, generando las VLPs observadas.

Mediante el método METTEM se pudo estudiar la distribución intracelular de la polimerasa de VBUN. La polimerasa viral L se detectó en el interior del CR, tanto en las esférulas como en los tubos virales. También se encontró en las membranas de un orgánulo celular, definiendo un compartimento que muy probablemente es el aparato de Golgi. Parece que cuando se sintetiza la polimerasa viral, es reclutada a las membranas del Golgi, donde se acumula para el ensamblaje del CR. Al inicio de la infección por VBUN se detectan esférulas en las cisternas del Golgi y tubos muy cortos, que se alargan a medida que progresa la infección. La detección de la polimerasa viral en las membranas de Golgi se correspondería con el transporte intracelular de la proteína hasta llegar a las esférulas, donde se acumula en gran cantidad para llevar a cabo la replicación viral. Los tubos virales podrían estar implicados en distintas

funciones como replicación viral o transferencia de las RNPs desde los sitios de replicación hasta los lugares de ensamblaje, lo que explicaría la presencia de la polimerasa L en dichas estructuras. El estudio detallado de los clusters de L-MT-oro mostró que las moléculas de polimerasa viral se organizaban de forma distinta en las membranas extensas y en el interior de las esférulas, presentando un mayor grado de empaquetamiento en estas últimas, lo que podría estar relacionado con su actividad. Las moléculas de L forman complejos con alto estado de agregación, generando matrices oligoméricas en 2D donde tendría lugar la replicación viral. El mayor empaquetamiento de la polimerasa viral de VBUN coincide con los datos obtenidos para la replicasa de TBSV (mostrados anteriormente en esta tesis doctoral) y también con estudios previos sobre otros virus. Se ha demostrado que las polimerasas de virus como FHV (Dye *et al.*, 2005), VHC (Qin *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002), TMV (Goregaoker and Culver, 2003) y BMV (O'Reilly *et al.*, 1997), VRUB (Fontana *et al.*, 2010), poliovirus (Lyle *et al.*, 2002; Hobson *et al.*, 2001) y coxsackievirus (Kemball *et al.*, 2010), se asocian generando matrices oligoméricas. Estos datos demuestran que las polimerasas pueden desempeñar una función estructural, además de enzimática, durante las infecciones virales.

Por lo tanto, las polimerasas de distintos virus ARN (VBUN y TBSV) no sólo se localizan en los CRs, sino también en las membranas de los orgánulos a partir de los cuales se forman dichos CRs, correspondiendo con el tráfico intracelular de las proteínas. Además, mediante METTEM se pudo visualizar la localización intracelular de las polimerasas de TBSV y VBUN, desde que son sintetizadas hasta que se incorporan al CR, aportando información nueva sobre su organización dentro de los CRs. Posteriormente, una vez caracterizada la factoría de VBUN en células Vero, se estudió el posible papel que desempeñan ciertas proteínas celulares (p32, Mfn-2 y miosina-9) en la formación y funcionamiento de la factoría de VBUN.

2.2. P32, Mfn-2 y miosina-9 en la factoría del VBUN

Durante la formación de la factoría del VBUN los orgánulos celulares implicados cambian su morfología, tamaño y localización, para generar una estructura membranosa altamente especializada. Como se ha mencionado anteriormente, el reclutamiento de mitocondrias suele ser un factor común en la mayoría de las factorías virales, las cuales podrían actuar como fuente energética, para suplir las necesidades del virus. Por otro lado, la mayor parte de los virus utilizan factores o proteínas celulares en distintas etapas de su ciclo vital, algunas de las cuales podrían proceder de las mitocondrias, como se ha propuesto recientemente (de Castro *et al.*, 2013).

En esta tesis doctoral se han estudiado dos proteínas mitocondriales p32 y Mfn-2. Es interesante estudiar la proteína p32 porque se ha asociado con infecciones producidas por otros virus ARN, en las cuales facilita la replicación viral y el reclutamiento de mitocondrias. Por ejemplo se ha localizado en los orgánulos de replicación ensamblados por el VRUB, en las mismas membranas donde también se encuentran las polimerasas y el ARN viral (Fontana *et al.*, 2010). Además, aunque es una proteína presente en la matriz mitocondrial también se encuentra en otras localizaciones como en el núcleo y la membrana plasmática, desplazándose a través del citoplasma para realizar ciertas funciones. Por otro lado, se estudió Mfn-2 porque es una proteína de la membrana mitocondrial externa pero también se relaciona con RE, regula los contactos que se establecen entre mitocondrias y entre mitocondrias y RE, que son los orgánulos reclutados alrededor del Golgi en la factoría del VBUN. Además, la agregación de mitocondrias en la zona perinuclear característica de la sobreexpresión de Mfn-2 (Rojo *et al.*, 2002), recuerda al patrón mitocondrial obtenido durante la infección por VBUN. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que p32 y Mfn-2 cambian su patrón de expresión en células infectadas, siendo reclutadas a la región perinuclear en etapas tempranas de la infección viral, coincidiendo con los marcadores de la factoría del VBUN. Además, el patrón de expresión de p32 cambia durante la infección por VBUN, ya que en etapas tardías da lugar a un patrón punteado que podría corresponder con la salida de la proteína de las mitocondrias. Se observó que p32 acompaña siempre a los elementos de la factoría a distintos tiempos post-infección, por lo que parece que p32 sale de las mitocondrias y se va a las mini-factorías generadas en células Vero. Por lo tanto, p32 podría ser uno de los factores que aportan las mitocondrias durante la infección por VBUN. Este resultado concuerda con lo observado para otros virus. Así, p32 sale de las mitocondrias y se concentra en los orgánulos de replicación del VRUB (Ilkow *et al.*, 2010; Fontana *et al.*, 2007). Además, la liberación de p32 de las mitocondrias en células Vero tiene lugar en una fase avanzada de la infección viral, lo que sitúa temporalmente la posible función de p32. Esta proteína podría interactuar con ciertas proteínas celulares y virales para regular distintos procesos como transporte y salida de virus, procesos característicos de etapas tardías de la infección. La capacidad de interactuar con otras proteínas y sus múltiples funciones sugieren que p32 podría ser un factor clave durante las infecciones producidas por distintos virus. Por otro lado, Mfn-2 está relacionada con los contactos que se establecen entre las mitocondrias y el RE. Como se ha visto más adelante, en las factorías de VBUN existen numerosos contactos entre las mitocondrias y distintos elementos de la factoría, concretamente RE. Dichos contactos podrían estar mediados por Mfn-2, lo que implicaría que la proteína sería importante para la conexión y mantenimiento de la factoría de VBUN. Estos datos sugieren que p32 y Mfn-2 podrían participar en procesos relacionados con la factoría del VBUN. Sin embargo, serían necesarios

experimentos adicionales para demostrar que realmente son factores necesarios para la biogénesis y funcionamiento de la factoría del VBUN.

Dentro de las factorías virales, factores virales y celulares tienen que ser transportados de manera eficiente para concentrar todos los elementos necesarios, y para conectar la replicación del genoma viral con el ensamblaje y morfogénesis de nuevos viriones (de Castro *et al.*, 2013). Las factorías virales constituyen estructuras macromoleculares complejas, que requieren el movimiento de moléculas entre los distintos subcompartimentos. Los virus utilizan el citoesqueleto y proteínas motoras así como el sistema de membranas de la célula, para el movimiento intracelular de los elementos necesarios para su replicación y ensamblaje (Harries *et al.*, 2010; Greber and Way, 2006; Radtke *et al.*, 2006; Boevink and Oparka, 2005). En la infección por VBUN se requiere un sistema que transporte las RNPs desde el sitio de replicación en las esférulas del Golgi hasta los lugares de ensamblaje también en las membranas del Golgi. La presencia de miosina-9 o NMHC-IIA en el CR de VBUN sugiere que dicha proteína podría mediar el transporte de las RNPs dentro de la factoría viral (Fontana *et al.*, 2008). Por otro lado, existe evidencia de que el citoesqueleto de actina y miosina están implicados en la compartimentalización y transporte de ARN en muchos tipos celulares (Calliari *et al.*, 2014). Por estos motivos se estudió el posible papel de la miosina-9 en las factorías del VBUN.

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que el patrón de expresión de NMHC-IIA-GFP cambia en células infectadas por VBUN. En condiciones normales se expresa en el citoplasma formando filamentos, pero con la infección viral es reclutada al aparato de Golgi, coincidiendo con proteína viral Gc. El reclutamiento de la NMHC-IIA al aparato de Golgi, sugiere una función de dicha proteína en la factoría viral durante la infección por VBUN. Por otro lado, se observó que el tratamiento con blebistatina (inhibidor específico de NMHC-IIA) en células de mamífero ralentiza la infección por VBUN, acumulándose mayor cantidad de proteína viral en el Golgi. La mayor concentración de glicoproteína viral en el Golgi, sugiere que el proceso de morfogénesis viral podría estar interrumpido. Se acumula glicoproteína Gc en el Golgi, posiblemente porque no están llegando las RNPs necesarias para la formación de nuevos virus, deteniendo el proceso en este punto. Además, mediante estudios de MET se observó una acumulación de material denso en el interior del dominio globular del CR que es donde se produce la replicación del genoma viral. La eliminación de NMHC-IIA podría estar ocasionando una acumulación de RNPs en las esférulas del orgánulo de replicación. La miosina-9 desempeña por tanto un importante papel durante la infección por VBUN, ya que se localiza en la factoría y su inactivación afecta notablemente a la progresión de la infección. Los datos obtenidos sugieren que podría estar implicada en el transporte de las RNPs recién sintetizadas desde los sitios de replicación a los lugares de ensamblaje.

Por lo tanto, las proteínas p32 y Mfn-2 podrían desempeñar funciones importantes en la biogénesis y funcionamiento de la factoría del VBUN. Además, miosina-9 podría mediar el transporte de RNPs dentro de la factoría. Estudios futuros deberán abordar la localización de estas proteínas en la factoría del VBUN mediante MET, para estudiar si Mfn-2 se encuentra en los contactos entre mitocondrias y los distintos elementos de la factoría. El bloqueo específico de la expresión de estas proteínas o la expresión de formas truncadas o mutantes de las mismas ayudará a determinar si dichas proteínas son en realidad utilizadas por el virus. Estos estudios serán importantes para la caracterización de las rutas de señalización intracelular modificadas por los virus durante las infecciones, vías que son mayormente desconocidas.

2.3. Estructura del producto final de la factoría: los virus infectivos

Las partículas infectivas del VBUN se componen de dos elementos principales: la envuelta viral, constituida por una membrana que procede del aparato de Golgi y en la que las interacciones laterales de las glicoproteínas dan lugar a una estructura icosaédrica (Bowden *et al.*, 2013; Salanueva *et al.*, 2003) y el interior del virus donde se empaquetan las ribonucleoproteínas. En esta tesis doctoral se estudiaron algunas características de ambos componentes estructurales.

Todos los bunyavirus codifican nucleoproteínas (NPs) que llevan a cabo la encapsidación del genoma. Sin embargo, la estructura, función y peso molecular de las NPs varían entre los distintos bunyavirus. En el caso de la NP de *Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus* (CCHFV), miembro del género *Nairovirus*, su estudio mediante cristalografía reveló que presentaba una actividad endonucleasa inusual, específica de ADN. Además, dicha NP guardaba gran similitud estructural con la NP de *Lassa fever virus* (LAFV) (Guo *et al.*, 2012). Por otro lado, estudios recientes han revelado que la NP del RVFV oligomeriza con distintas arquitecturas moleculares para facilitar la encapsidación del ARN (Raymond *et al.*, 2012; Ferron *et al.*, 2011; Raymond *et al.*, 2010). Así, en esta tesis doctoral se estudiaron las RNPs del VBUN, para obtener detalles de su estructura y compararlas con las de otros bunyavirus. Para ello, se visualizaron mediante tinción negativa las RNPs liberadas a partir de VBUN purificados de células BHK-21, y sometidos a ciclos de congelación-descongelación. La congelación induce la rotura controlada de la envuelta de los viriones y la salida de las RNPs, permitiendo su estudio sin alterar o modificar su estructura. La nucleoproteína del VBUN oligomeriza para asociarse con el ARN viral generando las RNPs (Li *et al.*, 2013). Dichas RNPs liberadas por los viriones del VBUN presentaron una estructura relajada, sin una marcada simetría helicoidal, muy similar a la observada en las RNPs de otros virus de la familia, como RVFV. Sin embargo, la estructura es claramente diferente de las del virus influenza u otros virus cuyo genoma es ssRNA (-) no

segmentado, en los cuales las RNPs presentan una estructura superenrollada (Ruigrok *et al.*, 2011). Así, el hecho de presentar un genoma segmentado podría estar relacionado con la estructura más relajada que muestran las RNPs de ciertos virus como el VBUN. Dicha estructura sería óptima para la replicación efectiva de los distintos segmentos y para el empaquetamiento dentro de los nuevos viriones (Li *et al.*, 2013). La oligomerización de la nucleoproteína del VBUN, por tanto, es clave para su interacción con el ARN viral, y formar las RNPs con la estructura relajada característica.

El otro componente estructural del VBUN, la envuelta, es el que determina la simetría de la partícula y su estructura está muy relacionada con la manera en la que interaccionan entre sí las moléculas de las dos glicoproteínas durante la morfogénesis. Estudios previos del laboratorio apuntan a la existencia de diferencias significativas en las rutas morfogenéticas del VBUN en células de mamífero y del mosquito vector (Lopez-Montero and Risco, 2011). Estas diferencias podrían estar relacionadas con el menor efecto citopático que experimentan las células de mosquito durante la infección (López-Montero, resultados no publicados) y también con la generación de partículas virales infectivas con envuelta estructuralmente diferentes en células de mamífero y de mosquito. Para comprobar esta hipótesis, en este trabajo se estudió la accesibilidad de los epítomos de las glicoproteínas en la superficie de virus purificados de células de mamífero (Vero) y del mosquito vector (C6/36). Se observó accesibilidad del epítipo de la glicoproteína Gc en virus procedentes de ambos tipos celulares. Sin embargo, la glicoproteína Gn sólo fue detectada en la superficie de los virus liberados por células de mosquito. Estos datos apuntan a diferencias en las rutas morfogenéticas presentes en los dos tipos celulares, generando virus con la misma composición de proteínas virales pero con diferencias en la estructura de la envuelta. Es importante destacar que en las células de mosquito los virus no se acumulan en las células para sufrir transformaciones morfogenéticas complejas, sino que se liberan rápidamente (Lopez-Montero and Risco, 2011). Diferencias en el estado de glicosidación y en las interacciones Gc-Gn pueden ser la causa de la distinta reactividad de los anticuerpos en la superficie de los dos tipos de VBUN infectivos.

Además, estudios con el *La Crosse encephalitis virus* (LACV) sugieren que Gc es la proteína de anclaje importante en células de mamífero, mientras que Gn sería más importante para la unión del virus a la superficie de células del mosquito vector (Ludwig *et al.*, 1991). Por lo tanto, la conformación que presenta la proteína Gn en la superficie de los virus purificados a partir de las células de mosquito podría ser una ventaja para la unión a los receptores de la superficie de ese tipo celular. Sin embargo, sigue siendo un tema conflictivo, ya que, otros estudios indican que Gc sería la glicoproteína importante para la unión a la superficie de ambos tipos celulares (Hacker and Hardy, 1997; Sundin *et al.*, 1987; Kingsford *et al.*, 1983). La

dinámica de la infección es diferente en células del mosquito vector, lo que se podría traducir en la generación de partículas virales un poco distintas pero igualmente infectivas. En el futuro será interesante realizar un estudio comparativo de proteómica entre los virus procedentes de mamífero y del mosquito vector para analizar la posible presencia de distintos factores celulares. También sería interesante comparar por crió-microscopía la estructura que presentan ambos virus, para buscar posibles diferencias en la conformación de las glicoproteínas.

En resumen, en esta tesis doctoral se ha estudiado la factoría del VBUN en células Vero, observando que se forman distintas mini-factorías alrededor de los fragmentos del aparato de Golgi, las cuales, presentan todos los elementos descritos previamente para la factoría única ensamblada en células BHK-21. El modelo 3D mostró que mitocondrias y RE rodean los fragmentos de Golgi, y que se establecen contactos entre las mitocondrias y el RE con los tubos virales y los virus intracelulares. Además, la polimerasa L y la nucleoproteína N son suficientes para ensamblar el CR funcional en el aparato de Golgi y reclutar los orgánulos celulares, mitocondrias y RE, formando la factoría del VBUN. Con la técnica METTEM se localizó la polimerasa en membranas intracelulares para concentrarse, finalmente, en el CR formando agregados con un alto grado de empaquetamiento. Por otro lado, proteínas mitocondriales como p32 y Mfn-2 podrían regular procesos asociados con la factoría del VBUN. Así, p32 sería uno de los factores liberados por la mitocondria en una etapa tardía de la infección viral; mientras que Mfn-2 podría mediar los contactos físicos que se dan entre las mitocondrias y el resto de elementos de la factoría. Otra proteína celular, miosina-9 es reclutada a la factoría del VBUN, y podría estar implicada en el transporte de RNPs desde los CRs hasta los sitios de ensamblaje. Finalmente, el estudio de virus purificados a partir de células de mamífero y del mosquito vector proporcionó datos estructurales nuevos sobre la organización de las RNPs y de las glicoproteínas de la envuelta en los virus ensamblados en ambos tipos celulares.

3. Reovirus

3.1. Presencia de membranas en las inclusiones formadas por reovirus

En el presente trabajo se ha demostrado que las inclusiones formadas por reovirus están asociadas con membranas celulares. La participación de membranas en el ensamblaje de las inclusiones virales ha supuesto un nuevo hallazgo en reovirus ya que se pensaba que estas estructuras carecían de membranas. Sin embargo, se ha demostrado que otros virus sin envuelta utilizan las membranas celulares. Así, la morfogénesis de rotavirus requiere el uso del RE para adquirir las proteínas de la cápsida externa VP4 y VP7 (Estes, 2013; Poruchynsky *et al.*, 1991). *Hyposoter exiguae* reovirus (reovirus que infecta la avispa *H. exiguae*) sale de las células

infectadas mediante *budding* (Stoltz and Makkay, 2000). Se ha demostrado que una parte importante de los Orbivirus son membranofílicos (Foster, 1979), además algunos presentan una pseudoenvuelta (Els and Verwoerd, 1969) o una envuelta transitoria (Hyatt *et al.*, 1993). Por lo tanto, la participación de membranas celulares en replicación y morfogénesis viral así como en salida de virus, podría ser una característica general en los virus dsRNA.

Estudios previos de la ultraestructura de las inclusiones de reovirus demostraron la presencia de microtúbulos, pero no se observaron membranas asociadas con dichas inclusiones virales (Ooms *et al.*, 2012; Dales *et al.*, 1965). Las diferencias en los resultados obtenidos podrían deberse al tiempo de post-infección seleccionado y a las estrategias utilizadas en MET. En los análisis de MET convencionales se analizan secciones ultrafinas de unos 50 nm de grosor. Estas secciones tienen que ser muy finas para facilitar el paso de los electrones a través de ellas. Secciones tan finas son planos únicos y no suelen abarcar el volumen completo de las estructuras y complejos macromoleculares estudiados, lo que conlleva una pérdida de información en el análisis. Además, hay menos probabilidades de observar fenómenos poco frecuentes. El estudio de monocapas orientadas y posterior reconstrucción 3D evita estas limitaciones, permitiendo el análisis de células completas y complejos macromoleculares de gran tamaño, así como visualizar los contactos o eventos poco frecuentes (de Castro *et al.*, 2013; Risco and Fernández de Castro, 2013; Fontana *et al.*, 2008). Esta estrategia de MET fue clave para visualizar adecuadamente las membranas dentro de las inclusiones de reovirus.

Los modelos 3D muestran la organización compleja de las inclusiones de reovirus, y la participación de membranas lisas, RER, mitocondrias y microtúbulos en la estructura de la inclusión viral. Estudios de microscopía confocal confirmaron que las inclusiones de reovirus estaban asociadas con el RE y el ERGIC pero no con el aparato de Golgi, sugiriendo que dicho orgánulo celular no contribuye a la formación de la inclusión (Fernández de Castro *et al.*, 2014). Las partículas virales se asocian con microtúbulos con cubierta (*coated*) y con membranas dentro de la inclusión. Los microtúbulos probablemente están recubiertos de la proteína viral $\mu 2$ (Parker *et al.*, 2002). Es posible que también se asocien a los microtúbulos otras proteínas virales y celulares. El análisis completo de secciones seriadas y reconstrucciones 3D ha permitido determinar que las inclusiones formadas en células Hela y MDCK están asociadas con mitocondrias, RER, y membranas lisas (probablemente derivadas del ERGIC). Las membranas lisas dentro de la inclusión podrían servir como soporte físico para el ensamblaje de la inclusión y para la organización de las proteínas estructurales y no estructurales de reovirus, requeridas para la replicación del genoma y para el ensamblaje de las partículas virales. El RER establece numerosos contactos con las inclusiones de reovirus, pero no las rodea completamente. Probablemente, en los ribosomas del RER se estén sintetizando proteínas virales que serán

incorporadas al CR. Esta posible función del RER se ha definido para otras infecciones virales, como es el caso de VRUB, donde el RER actúa de plataforma para la síntesis de proteínas virales con alta eficacia (Fontana *et al.*, 2010). Además, en el modelo 3D se observaron acumulaciones de lípidos o *lipid droplets* (LD) muy próximos a las inclusiones de reovirus. Estas reservas de lípidos podrían actuar como fuente de energía para la replicación viral y ensamblaje de nuevos virus. Se ha descrito la presencia de dicho orgánulo celular en las factorías virales de VHC y Dengue (Samsa *et al.*, 2009; Miyanari *et al.*, 2007; Barba *et al.*, 1997). Además de rodear la factoría de VHC y desempeñar una función estructural, los LDs son importantes durante la replicación de VHC (Paul *et al.*, 2013; Vogt *et al.*, 2013). La *tail-interacting protein 47* (TIP47), proteína celular que se asocia a los LDs, regula la replicación del VHC mediante la interacción con la proteína viral NS5A, y es requerida para que la replicación de VHC sea efectiva (Vogt *et al.*, 2013). Por lo tanto, al igual que ocurre en otras infecciones virales, la presencia de los LDs alrededor de las inclusiones de reovirus indica que dichas estructuras podrían participar en replicación y/o ensamblaje de nuevas partículas virales. Una posible función sería aportar factores importantes para la replicación viral.

Las mitocondrias son reclutadas a las factorías virales ensambladas por la mayoría de virus (de Castro *et al.*, 2013). En los modelos 3D de reovirus, las mitocondrias no solo rodean las inclusiones virales, sino que también establecen numerosos contactos con las membranas de la inclusión. También se detectaron conexiones con los otros elementos de la factoría, lo que implica que podrían actuar como estructuras que dan cohesión a la inclusión viral. Uniones de las mitocondrias con orgánulos celulares como Golgi, ERGIC o lisosomas no se han detectado en células de mamífero no infectadas (de Castro *et al.*, 2013). Las mitocondrias actuarían como fuente de energía para la replicación y ensamblaje viral, pero los contactos observados podrían estar relacionados también en este caso con la aportación de factores o proteínas necesarias para la replicación del virus. El RER también podría actuar como fuente de proteínas virales y celulares requeridas para las actividades de la inclusión.

Las inclusiones formadas en células MDCK con la cepa viral T3, la cual penetra dentro de la célula e induce la formación de la inclusión pero no completa el ciclo vital (Ooms *et al.*, 2010; Rodgers *et al.*, 1997), se caracterizan por contener gran cantidad de partículas virales vacías y muy pocos virus maduros lo que indica un defecto en morfogénesis. Además, las inclusiones formadas en este tipo celular presentaron membranas pero no microtúbulos. Este hecho sugiere que los microtúbulos son requeridos para la formación de inclusiones funcionales y para el ensamblaje de nuevas partículas virales. Los microtúbulos podrían estar implicados en el transporte de componentes esenciales para la formación, organización del contenido o compartimentalización de las funciones de la inclusión viral. El análisis de inclusiones próximas

a membrana plasmática, permitió observar que los virus están unidos a RE y microtúbulos en dicha zona. Por lo tanto, la salida de virus podría estar mediada por membranas de RE y microtúbulos. No se conoce el mecanismo a través del cual las partículas virales migran a la periferia celular y salen de las células. Se ha demostrado que la salida de reovirus se produce mediante lisis en ciertos tipos de células (Connolly *et al.*, 2001; Rodgers *et al.*, 1997; Tyler *et al.*, 1995). Sin embargo, en células endoteliales polarizadas (Lai *et al.*, 2013) y en células epiteliales (Excoffon *et al.*, 2008) la salida se produce de manera no citolítica. Además, en este trabajo se ha observado que en Hela y MDCK el virus tampoco sale de manera lítica. Todavía no se conoce el mecanismo mediante el cual los virus sin envuelta salen de las células infectadas sin la lisis de dichas células. Los datos de la reconstrucción 3D apuntan a que el RE y los microtúbulos podrían mediar el transporte de las partículas virales hasta la periferia celular y la cara citosólica de la membrana plasmática. En el caso de rotavirus, la salida de las partículas virales podría estar mediada por un transporte vesicular no convencional, a través de vesículas no derivadas del aparato de Golgi (Jourdan *et al.*, 1997). La proteína VP4 de rotavirus es fundamental para este proceso; la proteína carece de dominios transmembrana pero interacciona con lípidos (Cuadras *et al.*, 2006). Se ha demostrado que VP4 es esencial para la salida de rotavirus y que la liberación de virus podría estar mediada por los filamentos de actina, a los cuales se asocia VP4 (Gardet *et al.*, 2007). No se conoce ninguna proteína de reovirus que presente una función equivalente. Además, todas las proteínas de reovirus carecen de dominios transmembrana, y las modificaciones postraduccionales no están definidas por completo, aunque la proteína viral $\mu 1$ contiene un grupo miristoil (Nibert *et al.*, 1991). La lipidación o adición de moléculas hidrofóbicas a las proteínas de reovirus podría implicar el reclutamiento de membranas y el transporte de partículas a la periferia celular.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que reovirus forma inclusiones virales constituidas por membranas lisas, posiblemente procedentes del ERGIC, partículas virales y microtúbulos. Además, dichas estructuras están rodeadas de mitocondrias, RER y LDs. Los modelos 3D permitieron detectar contactos entre los distintos elementos de la factoría, que actuarían como vía de comunicación y transporte de elementos necesarios para la replicación y morfogénesis viral. Estos datos coinciden con lo demostrado para otros virus ARN, pero que no se había descrito previamente para reovirus. En el futuro será interesante determinar, utilizando microscopía correlativa óptica y electrónica, cuáles son los mecanismos implicados en la formación de las inclusiones de reovirus. También se podrán identificar las rutas implicadas en la biogénesis de las factorías utilizando inhibidores farmacológicos y deleciones de genes que codifican ciertas proteínas o factores celulares identificados como necesarios para la replicación

de reovirus (Mainou and Dermody, 2012). Por otro lado, se realizarán estudios de tomografía electrónica para estudiar el mecanismo de salida de reovirus de células infectadas.

Las aproximaciones utilizadas en esta tesis doctoral han permitido estudiar las factorías y los CRs formados por distintos virus ARN (tombusvirus, bunyavirus y reovirus). La obtención de cortes seriados y reconstrucciones 3D ha resultado muy útil para caracterizar los componentes que forman las factorías de dichos virus y para detectar contactos entre los distintos elementos de estas estructuras. Así, se ha observado que los CRs ensamblan en un orgánulo celular altamente modificado, y que está rodeado por mitocondrias y RE, los cuales aportarían energía y factores necesarios para la replicación. Además, se han utilizado técnicas de microscopía electrónica como METTEM que permite estudiar proteínas en células con alta sensibilidad y resolución, aportando información muy novedosa sobre la localización intracelular de las polimerasas virales y sobre su organización en el interior de los CRs. Estudios de METTEM y tomografía electrónica han mostrado por primera vez cómo se van organizando las moléculas de las polimerasas virales en las membranas celulares y cómo cambian su estado de agregación al constituir los complejos activos en replicación. También se han estudiado proteínas celulares importantes en la formación y funcionamiento de las factorías ensambladas por estos virus ARN. Por lo tanto, los datos obtenidos en este estudio constituyen un buen punto de partida para el análisis de las rutas de señalización implicadas en el reclutamiento de orgánulos y biogénesis de las factorías virales. El conocimiento de la biología celular relacionada con replicación viral podría ser de gran utilidad para la identificación de dianas y generación de nuevas terapias frente a virus patógenos.

Conclusiones

- 1) La factoría ensamblada por tombusvirus es un compartimento o sistema complejo de membranas donde se integran las esférulas virales, estructuras donde se ensamblan los CRs funcionales y donde se replica el genoma viral. Los modelos 3D muestran que dicho compartimento está rodeado de mitocondrias y RE. La técnica METTEM permitió visualizar las moléculas de la replicasa viral p33 en las membranas del compartimento y su reorganización y activación al incorporarse en las esférulas virales.
- 2) La proteína Vps4 es un componente estable del CR activo de tombusvirus y necesario para la formación y mantenimiento de las esférulas virales. Las otras proteínas ESCRT (Vps24, Vps23 y Snf7) también son necesarias para la formación de las esférulas de tombusvirus. En la levadura *Apah1* el virus ensambla el CR en un compartimento asociado al RE, constituyendo una plataforma de gran tamaño donde se lleva a cabo la replicación viral. La combinación de METTEM y tomografía electrónica mostró que en las regiones del compartimento donde la replicasa es activa, las moléculas presentan un alto grado de empaquetamiento. La inhibición de la actina en células de planta y levaduras produce una proliferación de las membranas especializadas que soportan la replicación de tombusvirus.
- 3) En células Vero el VBUN forma mini-factorías, constituidas por fragmentos del Golgi rodeados de mitocondrias y RE. En el modelo 3D se muestran contactos entre las mitocondrias y el RE con CRs y virus intracelulares. La nucleoproteína N y la polimerasa L son suficientes para ensamblar el CR funcional del VBUN, reclutar mitocondrias y RER constituyendo la factoría, e inducir la formación de pseudo-partículas virales. La polimerasa L se acumula en membranas intracelulares y en las esférulas virales, donde se concentra formando agregados densamente empaquetados en los que es activa en replicación.
- 4) Durante la infección por VBUN las proteínas mitocondriales p32 y Mfn-2 y la miosina-9 son reclutadas a la factoría viral. El reclutamiento de Mfn2 sugiere un papel de esta proteína en los contactos entre mitocondrias, y entre mitocondrias y RE dentro de la factoría. P32 acompaña siempre a los elementos de la factoría a distintos tiempos post-infección, sugiriendo que podría ser un factor importante en replicación viral y/o morfogénesis. El tratamiento con blebistatina sugiere un papel de la miosina-

- 9 en el transporte de las RNPs desde los CRs a los sitios de ensamblaje en las membranas del Golgi.
- 5) El modelo 3D muestra que las inclusiones de reovirus están constituidas por un entramado de membranas lisas y microtúbulos, rodeados de mitocondrias, RER y frecuentemente, gránulos lipídicos. Se establecen contactos entre las mitocondrias y el RER con el entramado de membranas de la inclusión y las partículas virales. En zonas de salida, junto a la membrana plasmática, los virus están unidos a elementos del RE y microtúbulos. Esto apunta a un mecanismo nuevo que podría mediar la salida del virus sin producir lisis celular.

Bibliografía

1. Antczak, J.B. and Joklik, W.K. (1992) Reovirus genome segment assortment into progeny genomes studied by the use of monoclonal antibodies directed against reovirus proteins. *Virology*. **187**: 760-776.
2. Arii, J., Goto, H., Suenaga, T., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Imai, T., *et al* (2010) Non-muscle myosin IIA is a functional entry receptor for herpes simplex virus-1. *Nature*. **467**: 859-862.
3. Barajas, D. and Nagy, P.D. (2010) Ubiquitination of tombusvirus p33 replication protein plays a role in virus replication and binding to the host Vps23p ESCRT protein. *Virology*. **397**: 358-368.
4. Barajas, D., Jiang, Y. and Nagy, P.D. (2009) A unique role for the host ESCRT proteins in replication of Tomato bushy stunt virus. *PLoS Pathog*. **5**: e1000705.
5. Barajas, D., Fernández de Castro, I., Pogany, J., Risco, C., Nagy, P. D. (2014) Noncanonical role for the host Vps4 AAA+ ATPase ESCRT protein in the formation of Tomato bushy stunt virus replicase. *PLoS Pathog*. **10**(4): e1004087.
6. Barba, G., Harper, F., Harada, T., Kohara, M., Goulinet, S., Matsuura, Y., *et al* (1997) Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**: 1200-1205.
7. Barton, E.S., Forrest, J.C., Connolly, J.L., Chappell, J.D., Liu, Y., Schnell, F.J., *et al* (2001) Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus. *Cell*. **104**: 441-451.
8. Beatch, M.D., Everitt, J.C., Law, L.J. and Hobman, T.C. (2005) Interactions between rubella virus capsid and host protein p32 are important for virus replication. *J Virol*. **79**: 10807-10820.
9. Beaty, B.J. and Bishop, D.H. (1988) Bunyavirus-vector interactions. *Virus Res*. **10**: 289-301.
10. Becker, M.M., Goral, M.I., Hazelton, P.R., Baer, G.S., Rodgers, S.E., Brown, E.G., *et al* (2001) Reovirus sigmaNS protein is required for nucleation of viral assembly complexes and formation of viral inclusions. *J Virol*. **75**: 1459-1475.
11. Belov, G.A., Nair, V., Hansen, B.T., Hoyt, F.H., Fischer, E.R. and Ehrenfeld, E. (2012) Complex dynamic development of poliovirus membranous replication complexes. *J Virol*. **86**: 302-312.
12. Bettinger, B.T., Gilbert, D.M. and Amberg, D.C. (2004) Actin up in the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **5**: 410-415.
13. Beyersmann, D. and Haase, H. (2001) Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biometals*. **14**: 331-341.
14. Boehme, K.W., Lai, C.M. and Dermody, T.S. (2013) Mechanisms of reovirus bloodstream dissemination. *Adv Virus Res*. **87**: 1-35.
15. Boevink, P. and Oparka, K.J. (2005) Virus-host interactions during movement processes. *Plant Physiol*. **138**: 1815-1821.

16. Bouchet-Marquis, C., Pagratis, M., Kirmse, R. and Hoenger, A. (2012) Metallothionein as a clonable high-density marker for cryo-electron microscopy. *J Struct Biol.* **177**: 119-127.
17. Bowden, T.A., Bitto, D., McLees, A., Yeromonahos, C., Elliott, R.M. and Huisken, J.T. (2013) Orthobunyavirus ultrastructure and the curious tripodal glycoprotein spike. *PLoS Pathog.* **9**: e1003374.
18. Bowers, K. and Stevens, T.H. (2005) Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* **1744**: 438-454.
19. Bridgen, A., Weber, F., Fazakerley, J.K. and Elliott, R.M. (2001) Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**: 664-669.
20. Briese, T., Rambaut, A. and Lipkin, W.I. (2004) Analysis of the medium (M) segment sequence of Guaro virus and its comparison to other orthobunyaviruses. *J Gen Virol.* **85**: 3071-3077.
21. Broering, T.J., Parker, J.S., Joyce, P.L., Kim, J. and Nibert, M.L. (2002) Mammalian reovirus nonstructural protein microNS forms large inclusions and colocalizes with reovirus microtubule-associated protein micro2 in transfected cells. *J Virol.* **76**: 8285-8297.
22. Buchholz, U.J., Finke, S. and Conzelmann, K.K. (1999) Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J Virol.* **73**: 251-259.
23. Burke, E., Mahoney, N.M., Almo, S.C. and Barik, S. (2000) Profilin is required for optimal actin-dependent transcription of respiratory syncytial virus genome RNA. *J Virol.* **74**: 669-675.
24. Butt, T.R. and Ecker, D.J. (1987) Yeast metallothionein and applications in biotechnology. *Microbiol Rev.* **51**: 351-364.
25. Butt, T.R., Sternberg, E.J., Gorman, J.A., Clark, P., Hamer, D., Rosenberg, M. and Crooke, S.T. (1984) Copper metallothionein of yeast, structure of the gene, and regulation of expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **81**: 3332-3336.
26. Calliari, A., Farias, J., Puppo, A., Canclini, L., Mercer, J.A., Munroe, D., *et al* (2014) Myosin Va associates with mRNA in ribonucleoprotein particles present in myelinated peripheral axons and in the central nervous system. *Dev Neurobiol.* **74**: 382-396.
27. Carette, J.E., Stuver, M., Van Lent, J., Wellink, J. and Van Kammen, A. (2000) Cowpea mosaic virus infection induces a massive proliferation of endoplasmic reticulum but not Golgi membranes and is dependent on de novo membrane synthesis. *J Virol.* **74**: 6556-6563.
28. Claus, C., Chey, S., Heinrich, S., Reins, M., Richardt, B., Pinkert, S., *et al* (2011) Involvement of p32 and microtubules in alteration of mitochondrial functions by rubella virus. *J Virol.* **85**: 3881-3892.

-
29. Coetzee, P., Van Vuuren, M., Stokstad, M., Myrmel, M. and Venter, E.H. (2012) Bluetongue virus genetic and phenotypic diversity: towards identifying the molecular determinants that influence virulence and transmission potential. *Vet Microbiol.* **161**: 1-12.
 30. Connolly, J.L., Barton, E.S. and Dermody, T.S. (2001) Reovirus binding to cell surface sialic acid potentiates virus-induced apoptosis. *J Virol.* **75**: 4029-4039.
 31. Coombs, K.M. (2006) Reovirus structure and morphogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* **309**: 117-167.
 32. Cosson, P., Marchetti, A., Ravazzola, M. and Orci, L. (2012) Mitofusin-2 independent juxtaposition of endoplasmic reticulum and mitochondria: an ultrastructural study. *PLoS One.* **7**: e46293.
 33. Cuadras, M.A., Bordier, B.B., Zambrano, J.L., Ludert, J.E. and Greenberg, H.B. (2006) Dissecting rotavirus particle-raft interaction with small interfering RNAs: insights into rotavirus transit through the secretory pathway. *J Virol.* **80**: 3935-3946.
 34. Cudmore, S., Reckmann, I. and Way, M. (1997) Viral manipulations of the actin cytoskeleton. *Trends Microbiol.* **5**: 142-148.
 35. Chang, L., Godinez, W.J., Kim, I.H., Tektonidis, M., de Lanerolle, P., Eils, R., *et al* (2011) Herpesviral replication compartments move and coalesce at nuclear speckles to enhance export of viral late mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**: E136-144.
 36. Chappell, J.D., Duong, J.L., Wright, B.W. and Dermody, T.S. (2000) Identification of carbohydrate-binding domains in the attachment proteins of type 1 and type 3 reoviruses. *J Virol.* **74**: 8472-8479.
 37. Chappell, J.D., Protta, A.E., Dermody, T.S. and Stehle, T. (2002) Crystal structure of reovirus attachment protein sigma1 reveals evolutionary relationship to adenovirus fiber. *Embo J.* **21**: 1-11.
 38. Cherry, S., Kunte, A., Wang, H., Coyne, C., Rawson, R.B. and Perrimon, N. (2006) COPI activity coupled with fatty acid biosynthesis is required for viral replication. *PLoS Pathog.* **2**: e102.
 39. Chuang, C., Barajas, D., Qin, J. and Nagy, P.D. (2014) Inactivation of the host lipin gene accelerates RNA virus replication through viral exploitation of the expanded endoplasmic reticulum membrane. *PLoS Pathog.* **10**: e1003944.
 40. Dales, S. (1963) Association between the Spindle Apparatus and Reovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **50**: 268-275.
 41. Dales, S., Gomatos, P.J. and Hsu, K.C. (1965) The Uptake and Development of Reovirus in Strain L Cells Followed with Labeled Viral Ribonucleic Acid and Ferritin-Antibody Conjugates. *Virology.* **25**: 193-211.
 42. Dalmay, T., Rubino, L., Burgyan, J., Kollar, A. and Russo, M. (1993) Functional analysis of cymbidium ringspot virus genome. *Virology.* **194**: 697-704.

43. Danthi, P., Guglielmi, K.M., Kirchner, E., Mainou, B., Stehle, T. and Dermody, T.S. (2010) From touchdown to transcription: the reovirus cell entry pathway. *Curr Top Microbiol Immunol.* **343**: 91-119.
44. Davis, W.G., Blackwell, J.L., Shi, P.Y. and Brinton, M.A. (2007) Interaction between the cellular protein eEF1A and the 3'-terminal stem-loop of West Nile virus genomic RNA facilitates viral minus-strand RNA synthesis. *J Virol.* **81**: 10172-10187.
45. de Castro, I.F., Volonte, L. and Risco, C. (2013) Virus factories: biogenesis and structural design. *Cell Microbiol.* **15**: 24-34.
46. den Boon, J.A. and Ahlquist, P. (2010) Organelle-like membrane compartmentalization of positive-strand RNA virus replication factories. *Annu Rev Microbiol.* **64**: 241-256.
47. Deng, Y., Almsherqi, Z.A., Ng, M.M. and Kohlwein, S.D. (2010) Do viruses subvert cholesterol homeostasis to induce host cubic membranes? *Trends Cell Biol.* **20**: 371-379.
48. Dermody, T.S., Nibert, M.L., Bassel-Duby, R. and Fields, B.N. (1990) A sigma 1 region important for hemagglutination by serotype 3 reovirus strains. *J Virol.* **64**: 5173-5176.
49. Dermody, T.S., Parker, J. S., & Sherry, B (2013) Orthoreoviruses. In *Fields Virology. Sixth Edition*. Wilkins, L.W. (ed.) Philadelphia
50. pp. 1304–1346.
51. Desvoyes, B., Faure-Rabasse, S., Chen, M.H., Park, J.W. and Scholthof, H.B. (2002) A novel plant homeodomain protein interacts in a functionally relevant manner with a virus movement protein. *Plant Physiol.* **129**: 1521-1532.
52. Diaz, A., Wang, X. and Ahlquist, P. (2010) Membrane-shaping host reticulon proteins play crucial roles in viral RNA replication compartment formation and function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**: 16291-16296.
53. Diestra, E., Cayrol, B., Arluison, V. and Risco, C. (2009a) Cellular electron microscopy imaging reveals the localization of the Hfq protein close to the bacterial membrane. *PLoS One.* **4**: e8301.
54. Diestra, E., Fontana, J., Guichard, P., Marco, S. and Risco, C. (2009b) Visualization of proteins in intact cells with a clonable tag for electron microscopy. *J Struct Biol.* **165**: 157-168.
55. Doucas, V., Ishov, A.M., Romo, A., Juguilon, H., Weitzman, M.D., Evans, R.M. and Maul, G.G. (1996) Adenovirus replication is coupled with the dynamic properties of the PML nuclear structure. *Genes Dev.* **10**: 196-207.
56. Dunn, E.F., Pritlove, D.C., Jin, H. and Elliott, R.M. (1995) Transcription of a recombinant bunyavirus RNA template by transiently expressed bunyavirus proteins. *Virology.* **211**: 133-143.

-
57. Dye, B.T., Miller, D.J. and Ahlquist, P. (2005) In vivo self-interaction of nodavirus RNA replicase protein revealed by fluorescence resonance energy transfer. *J Virol.* **79**: 8909-8919.
58. Els, H.J. and Verwoerd, D.W. (1969) Morphology of bluetongue virus. *Virology.* **38**: 213-219.
59. Elliott, R.M. (1990) Molecular biology of the Bunyaviridae. *J Gen Virol.* **71** (Pt 3): 501-522.
60. Erickson, K.D., Bouchet-Marquis, C., Heiser, K., Szomolanyi-Tsuda, E., Mishra, R., Lamothe, B., *et al* (2012) Virion assembly factories in the nucleus of polyomavirus-infected cells. *PLoS Pathog.* **8**: e1002630.
61. Estes, M.K., Greenberg, H.B. (2013) Rotaviruses. In *Fields virology*, 6th ed. Knipe DM, H.P. (ed.) Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 1347–1401.
62. Excoffon, K.J., Guglielmi, K.M., Wetzel, J.D., Gansemer, N.D., Campbell, J.A., Dermody, T.S. and Zabner, J. (2008) Reovirus preferentially infects the basolateral surface and is released from the apical surface of polarized human respiratory epithelial cells. *J Infect Dis.* **197**: 1189-1197.
63. Feng, Z., Hensley, L., McKnight, K.L., Hu, F., Madden, V., Ping, L., *et al* (2013) A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *Nature.* **496**: 367-371.
64. Fernández de Castro, I., Zamora, P.F., Ooms, L., Fernandez, J.J., Lai, C.M., Mainou, B.A., *et al* (2014) Reovirus Forms Neo-Organelles for Progeny Particle Assembly within Reorganized Cell Membranes. *MBio.* **5**: e00931-00913.
65. Fernández de Castro, I., Sanz-Sánchez, L., Risco, C. (2014) Metallothioneins for correlative light and electron microscopy. In *Methods in cell biology* **In press**.
66. Ferron, F., Li, Z., Danek, E.I., Luo, D., Wong, Y., Coutard, B., *et al* (2011) The hexamer structure of Rift Valley fever virus nucleoprotein suggests a mechanism for its assembly into ribonucleoprotein complexes. *PLoS Pathog.* **7**: e1002030.
67. Fontana, J., Lopez-Montero, N., Elliott, R.M., Fernandez, J.J. and Risco, C. (2008) The unique architecture of Bunyamwera virus factories around the Golgi complex. *Cell Microbiol.* **10**: 2012-2028.
68. Fontana, J., Tzeng, W.P., Calderita, G., Fraile-Ramos, A., Frey, T.K. and Risco, C. (2007) Novel replication complex architecture in rubella replicon-transfected cells. *Cell Microbiol.* **9**: 875-890.
69. Fontana, J., Lopez-Iglesias, C., Tzeng, W.P., Frey, T.K., Fernandez, J.J. and Risco, C. (2010) Three-dimensional structure of Rubella virus factories. *Virology.* **405**: 579-591.
70. Foster, N., Alders, M. (1979) Bluetongue virus: a membraned structure. In *Proc. Annu. Meet. Microsc. Soc. Am. America*, M.S.o. (ed.) Reston, pp. 48–49.

71. Frolova, E.I., Gorchakov, R., Pereboeva, L., Atasheva, S. and Frolov, I. (2010) Functional Sindbis virus replicative complexes are formed at the plasma membrane. *J Virol.* **84**: 11679-11695.
72. Furey, W.F., Robbins, A.H., Clancy, L.L., Winge, D.R., Wang, B.C. and Stout, C.D. (1986) Crystal structure of Cd,Zn metallothionein. *Science.* **231**: 704-710.
73. Gardet, A., Breton, M., Trugnan, G. and Chwetzoff, S. (2007) Role for actin in the polarized release of rotavirus. *J Virol.* **81**: 4892-4894.
74. Garzon, S., Strykowski, H. and Charpentier, G. (1990) Implication of mitochondria in the replication of Nodamura virus in larvae of the Lepidoptera, *Galleria mellonella* (L.) and in suckling mice. *Arch Virol.* **113**: 165-176.
75. Ghaemmaghami, S., Huh, W.K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., *et al* (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature.* **425**: 737-741.
76. Ghebrehwet, B., Lim, B.L., Kumar, R., Feng, X. and Peerschke, E.I. (2001) gC1q-R/p33, a member of a new class of multifunctional and multicompartmental cellular proteins, is involved in inflammation and infection. *Immunol Rev.* **180**: 65-77.
77. Giepmans, B.N., Adams, S.R., Ellisman, M.H. and Tsien, R.Y. (2006) The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science.* **312**: 217-224.
78. Goldsmith, C.S., Tatti, K.M., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Comer, J.A., Lee, W.W., *et al* (2004) Ultrastructural characterization of SARS coronavirus. *Emerg Infect Dis.* **10**: 320-326.
79. Goregaoker, S.P. and Culver, J.N. (2003) Oligomerization and activity of the helicase domain of the tobacco mosaic virus 126- and 183-kilodalton replicase proteins. *J Virol.* **77**: 3549-3556.
80. Grangeon, R., Agbeci, M., Chen, J., Grondin, G., Zheng, H. and Laliberte, J.F. (2012) Impact on the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus of turnip mosaic virus infection. *J Virol.* **86**: 9255-9265.
81. Granzow, H., Weiland, F., Jons, A., Klupp, B.G., Karger, A. and Mettenleiter, T.C. (1997) Ultrastructural analysis of the replication cycle of pseudorabies virus in cell culture: a reassessment. *J Virol.* **71**: 2072-2082.
82. Granzow, H., Klupp, B.G., Fuchs, W., Veits, J., Osterrieder, N. and Mettenleiter, T.C. (2001) Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J Virol.* **75**: 3675-3684.
83. Greber, U.F. and Way, M. (2006) A superhighway to virus infection. *Cell.* **124**: 741-754.
84. Grunewald, K., Desai, P., Winkler, D.C., Heymann, J.B., Belnap, D.M., Baumeister, W. and Steven, A.C. (2003) Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography. *Science.* **302**: 1396-1398.
85. Guinea, R. and Carrasco, L. (1990) Phospholipid biosynthesis and poliovirus genome replication, two coupled phenomena. *Embo J.* **9**: 2011-2016.

-
86. Guizetti, J. and Gerlich, D.W. (2012) ESCRT-III polymers in membrane neck constriction. *Trends Cell Biol.* **22**: 133-140.
87. Guo, Y., Wang, W., Ji, W., Deng, M., Sun, Y., Zhou, H., *et al* (2012) Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleoprotein reveals endonuclease activity in bunyaviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **109**: 5046-5051.
88. Gupta, S., De, B.P., Drazba, J.A. and Banerjee, A.K. (1998) Involvement of actin microfilaments in the replication of human parainfluenza virus type 3. *J Virol.* **72**: 2655-2662.
89. Hacker, J.K. and Hardy, J.L. (1997) Adsorptive endocytosis of California encephalitis virus into mosquito and mammalian cells: a role for G1. *Virology.* **235**: 40-47.
90. Handa, Y., Durkin, C.H., Dodding, M.P. and Way, M. (2013) Vaccinia virus F11 promotes viral spread by acting as a PDZ-containing scaffolding protein to bind myosin-9A and inhibit RhoA signaling. *Cell Host Microbe.* **14**: 51-62.
91. Harries, P.A., Schoelz, J.E. and Nelson, R.S. (2010) Intracellular transport of viruses and their components: utilizing the cytoskeleton and membrane highways. *Mol Plant Microbe Interact.* **23**: 1381-1393.
92. Heaton, N.S., Perera, R., Berger, K.L., Khadka, S., Lacount, D.J., Kuhn, R.J. and Randall, G. (2010) Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**: 17345-17350.
93. Hillman, B.I., Hearne, P., Rochon, D. and Morris, T.J. (1989) Organization of tomato bushy stunt virus genome: characterization of the coat protein gene and the 3' terminus. *Virology.* **169**: 42-50.
94. Hobson, S.D., Rosenblum, E.S., Richards, O.C., Richmond, K., Kirkegaard, K. and Schultz, S.C. (2001) Oligomeric structures of poliovirus polymerase are important for function. *Embo J.* **20**: 1153-1163.
95. Hoffmann, A. and Nebenfuhr, A. (2004) Dynamic rearrangements of transvacuolar strands in BY-2 cells imply a role of myosin in remodeling the plant actin cytoskeleton. *Protoplasma.* **224**: 201-210.
96. Huang, C.Y., Chiang, S.F., Lin, T.Y., Chiou, S.H. and Chow, K.C. (2012) HIV-1 Vpr triggers mitochondrial destruction by impairing Mfn2-mediated ER-mitochondria interaction. *PLoS One.* **7**: e33657.
97. Huang, T.S. and Nagy, P.D. (2011) Direct inhibition of tombusvirus plus-strand RNA synthesis by a dominant negative mutant of a host metabolic enzyme, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in yeast and plants. *J Virol.* **85**: 9090-9102.
98. Hurley, J.H. and Emr, S.D. (2006) The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* **35**: 277-298.
99. Hurley, J.H. and Hanson, P.I. (2010) Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **11**: 556-566.
-

100. Hurley, J.H., Boura, E., Carlson, L.A. and Rozycki, B. (2010) Membrane budding. *Cell*. **143**: 875-887.
101. Hyatt, A.D., Zhao, Y. and Roy, P. (1993) Release of bluetongue virus-like particles from insect cells is mediated by BTV nonstructural protein NS3/NS3A. *Virology*. **193**: 592-603.
102. Ilkow, C.S., Weckbecker, D., Cho, W.J., Meier, S., Beatch, M.D., Goping, I.S., *et al* (2010) The rubella virus capsid protein inhibits mitochondrial import. *J Virol*. **84**: 119-130.
103. Itahana, K. and Zhang, Y. (2008) Mitochondrial p32 is a critical mediator of ARF-induced apoptosis. *Cancer Cell*. **13**: 542-553.
104. Ivanovic, T., Boulant, S., Ehrlich, M., Demidenko, A.A., Arnold, M.M., Kirchhausen, T. and Nibert, M.L. (2011) Recruitment of cellular clathrin to viral factories and disruption of clathrin-dependent trafficking. *Traffic*. **12**: 1179-1195.
105. Jaag, H.M., Pogany, J. and Nagy, P.D. (2010) A host Ca²⁺/Mn²⁺ ion pump is a factor in the emergence of viral RNA recombinants. *Cell Host Microbe*. **7**: 74-81.
106. Jiang, Y., Serviène, E., Gal, J., Panavas, T. and Nagy, P.D. (2006) Identification of essential host factors affecting tombusvirus RNA replication based on the yeast Tet promoters Hughes Collection. *J Virol*. **80**: 7394-7404.
107. Jin, H. and Elliott, R.M. (1993) Characterization of Bunyamwera virus S RNA that is transcribed and replicated by the L protein expressed from recombinant vaccinia virus. *J Virol*. **67**: 1396-1404.
108. Jourdan, N., Maurice, M., Delautier, D., Quero, A.M., Servin, A.L. and Trugnan, G. (1997) Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi apparatus. *J Virol*. **71**: 8268-8278.
109. Kakani, K., Sgro, J.Y. and Rochon, D. (2001) Identification of specific cucumber necrosis virus coat protein amino acids affecting fungus transmission and zoospore attachment. *J Virol*. **75**: 5576-5583.
110. Katzmann, D.J., Odorizzi, G. and Emr, S.D. (2002) Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **3**: 893-905.
111. Kaufer, S., Coffey, C.M. and Parker, J.S. (2012) The cellular chaperone hsc70 is specifically recruited to reovirus viral factories independently of its chaperone function. *J Virol*. **86**: 1079-1089.
112. Kemball, C.C., Alirezai, M., Flynn, C.T., Wood, M.R., Harkins, S., Kiesses, W.B. and Whitton, J.L. (2010) Cocksackievirus infection induces autophagy-like vesicles and megaphagosomes in pancreatic acinar cells in vivo. *J Virol*. **84**: 12110-12124.
113. Kim, J., Parker, J.S., Murray, K.E. and Nibert, M.L. (2004) Nucleoside and RNA triphosphatase activities of orthoreovirus transcriptase cofactor mu2. *J Biol Chem*. **279**: 4394-4403.

-
114. Kimura, T., Hashimoto, I., Nishikawa, M. and Fujisawa, J.I. (1996) A role for Rev in the association of HIV-1 gag mRNA with cytoskeletal beta-actin and viral protein expression. *Biochimie*. **78**: 1075-1080.
115. Kingsford, L., Ishizawa, L.D. and Hill, D.W. (1983) Biological activities of monoclonal antibodies reactive with antigenic sites mapped on the G1 glycoprotein of La Crosse virus. *Virology*. **129**: 443-455.
116. Kireev, I., Lakonishok, M., Liu, W., Joshi, V.N., Powell, R. and Belmont, A.S. (2008) In vivo immunogold labeling confirms large-scale chromatin folding motifs. *Nat Methods*. **5**: 311-313.
117. Knoops, K., Barcena, M., Limpens, R.W., Koster, A.J., Mommaas, A.M. and Snijder, E.J. (2012) Ultrastructural characterization of arterivirus replication structures: reshaping the endoplasmic reticulum to accommodate viral RNA synthesis. *J Virol*. **86**: 2474-2487.
118. Knoops, K., Kikkert, M., Worm, S.H., Zevenhoven-Dobbe, J.C., van der Meer, Y., Koster, A.J., *et al* (2008) SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol*. **6**: e226.
119. Kobayashi, T., Chappell, J.D., Danthi, P. and Dermody, T.S. (2006) Gene-specific inhibition of reovirus replication by RNA interference. *J Virol*. **80**: 9053-9063.
120. Kobayashi, T., Ooms, L.S., Chappell, J.D. and Dermody, T.S. (2009) Identification of functional domains in reovirus replication proteins muNS and mu2. *J Virol*. **83**: 2892-2906.
121. Kohl, A., Lowen, A.C., Leonard, V.H. and Elliott, R.M. (2006) Genetic elements regulating packaging of the Bunyamwera orthobunyavirus genome. *J Gen Virol*. **87**: 177-187.
122. Kohl, A., Hart, T.J., Noonan, C., Royall, E., Roberts, L.O. and Elliott, R.M. (2004) A bunyamwera virus minireplicon system in mosquito cells. *J Virol*. **78**: 5679-5685.
123. Kopek, B.G., Perkins, G., Miller, D.J., Ellisman, M.H. and Ahlquist, P. (2007) Three-dimensional analysis of a viral RNA replication complex reveals a virus-induced mini-organelle. *PLoS Biol*. **5**: e220.
124. Kopito, R.R. (2000) Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol*. **10**: 524-530.
125. Kozak, M. (1989) The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol*. **108**: 229-241.
126. Kremer, J.R., Mastronarde, D.N. and McIntosh, J.R. (1996) Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J Struct Biol*. **116**: 71-76.
127. Lai, C.M., Mainou, B.A., Kim, K.S. and Dermody, T.S. (2013) Directional release of reovirus from the apical surface of polarized endothelial cells. *MBio*. **4**: e00049-00013.

128. Lanman, J., Crum, J., Deerinck, T.J., Gaietta, G.M., Schneemann, A., Sosinsky, G.E., *et al* (2008) Visualizing flock house virus infection in *Drosophila* cells with correlated fluorescence and electron microscopy. *J Struct Biol.* **161**: 439-446.
129. Lappin, D.F., Nakitare, G.W., Palfreyman, J.W. and Elliott, R.M. (1994) Localization of Bunyamwera bunyavirus G1 glycoprotein to the Golgi requires association with G2 but not with NSm. *J Gen Virol.* **75** (Pt 12): 3441-3451.
130. Lee, W.M., Ishikawa, M. and Ahlquist, P. (2001) Mutation of host delta9 fatty acid desaturase inhibits brome mosaic virus RNA replication between template recognition and RNA synthesis. *J Virol.* **75**: 2097-2106.
131. Li, B., Wang, Q., Pan, X., Fernández de Castro, I., Sun, Y., Guo, Y., *et al* (2013) Bunyamwera virus possesses a distinct nucleocapsid protein to facilitate genome encapsidation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **110**: 9048-9053.
132. Li, Z., Barajas, D., Panavas, T., Herbst, D.A. and Nagy, P.D. (2008) Cdc34p ubiquitin-conjugating enzyme is a component of the tombusvirus replicase complex and ubiquitinates p33 replication protein. *J Virol.* **82**: 6911-6926.
133. Li, Z., Pogany, J., Tupman, S., Esposito, A.M., Kinzy, T.G. and Nagy, P.D. (2010) Translation elongation factor 1A facilitates the assembly of the tombusvirus replicase and stimulates minus-strand synthesis. *PLoS Pathog.* **6**: e1001175.
134. Li, Z., Pogany, J., Panavas, T., Xu, K., Esposito, A.M., Kinzy, T.G. and Nagy, P.D. (2009) Translation elongation factor 1A is a component of the tombusvirus replicase complex and affects the stability of the p33 replication co-factor. *Virology.* **385**: 245-260.
135. Limpens, R.W., van der Schaar, H.M., Kumar, D., Koster, A.J., Snijder, E.J., van Kuppeveld, F.J. and Barcena, M. (2011) The transformation of enterovirus replication structures: a three-dimensional study of single- and double-membrane compartments. *MBio.* **2**.
136. Lopez-Montero, N. and Risco, C. (2011) Self-protection and survival of arbovirus-infected mosquito cells. *Cell Microbiol.* **13**: 300-315.
137. Lowen, A.C. and Elliott, R.M. (2005) Mutational analyses of the nonconserved sequences in the Bunyamwera Orthobunyavirus S segment untranslated regions. *J Virol.* **79**: 12861-12870.
138. Ludwig, G.V., Israel, B.A., Christensen, B.M., Yuill, T.M. and Schultz, K.T. (1991) Role of La Crosse virus glycoproteins in attachment of virus to host cells. *Virology.* **181**: 564-571.
139. Lukacs, N. (1994) Detection of virus infection in plants and differentiation between coexisting viruses by monoclonal antibodies to double-stranded RNA. *J Virol Methods.* **47**: 255-272.
140. Lyle, J.M., Bullitt, E., Bienz, K. and Kirkegaard, K. (2002) Visualization and functional analysis of RNA-dependent RNA polymerase lattices. *Science.* **296**: 2218-2222.

-
141. Mackenzie, J.M., Khromykh, A.A. and Parton, R.G. (2007) Cholesterol manipulation by West Nile virus perturbs the cellular immune response. *Cell Host Microbe*. **2**: 229-239.
142. Maginnis, M.S., Forrest, J.C., Kopecky-Bromberg, S.A., Dickeson, S.K., Santoro, S.A., Zutter, M.M., *et al* (2006) Beta1 integrin mediates internalization of mammalian reovirus. *J Virol*. **80**: 2760-2770.
143. Mainou, B.A. and Dermody, T.S. (2012) Transport to late endosomes is required for efficient reovirus infection. *J Virol*. **86**: 8346-8358.
144. Majeau, N., Fromentin, R., Savard, C., Duval, M., Tremblay, M.J. and Leclerc, D. (2009) Palmitoylation of hepatitis C virus core protein is important for virion production. *J Biol Chem*. **284**: 33915-33925.
145. Malerod, L. and Stenmark, H. (2009) ESCRTing membrane deformation. *Cell*. **136**: 15-17.
146. Mallardo, M., Schleich, S. and Krijnse Locker, J. (2001) Microtubule-dependent organization of vaccinia virus core-derived early mRNAs into distinct cytoplasmic structures. *Mol Biol Cell*. **12**: 3875-3891.
147. Martin-Acebes, M.A., Blazquez, A.B., Jimenez de Oya, N., Escribano-Romero, E. and Saiz, J.C. (2011) West Nile virus replication requires fatty acid synthesis but is independent on phosphatidylinositol-4-phosphate lipids. *PLoS One*. **6**: e24970.
148. Martinez-Sanchez, A., Garcia, I. and Fernandez, J.J. (2011) A differential structure approach to membrane segmentation in electron tomography. *J Struct Biol*. **175**: 372-383.
149. Martinez-Sanchez, A., Garcia, I. and Fernandez, J.J. (2013) A ridge-based framework for segmentation of 3D electron microscopy datasets. *J Struct Biol*. **181**: 61-70.
150. Martinez-Sanchez, A., Garcia, I., Asano, S., Lucic, V., Fernandez, J.J. (2014) Robust membrane detection based on tensor voting for electron tomography. *Journal of Structural Biology*. **186**: 49-61.
151. Maul, G.G., Ishov, A.M. and Everett, R.D. (1996) Nuclear domain 10 as preexisting potential replication start sites of herpes simplex virus type-1. *Virology*. **217**: 67-75.
152. Maul, G.G., Negorev, D., Bell, P. and Ishov, A.M. (2000) Review: properties and assembly mechanisms of ND10, PML bodies, or PODs. *J Struct Biol*. **129**: 278-287.
153. McCartney, A.W., Greenwood, J.S., Fabian, M.R., White, K.A. and Mullen, R.T. (2005) Localization of the tomato bushy stunt virus replication protein p33 reveals a peroxisome-to-endoplasmic reticulum sorting pathway. *Plant Cell*. **17**: 3513-3531.
154. Mercogliano, C.P. and DeRosier, D.J. (2006) Gold nanocluster formation using metallothionein: mass spectrometry and electron microscopy. *J Mol Biol*. **355**: 211-223.
155. Mercogliano, C.P. and DeRosier, D.J. (2007) Concatenated metallothionein as a clonable gold label for electron microscopy. *J Struct Biol*. **160**: 70-82.

156. Miller, S. and Krijnse-Locker, J. (2008) Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat Rev Microbiol.* **6**: 363-374.
157. Miller, W.A. and Koev, G. (2000) Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses. *Virology.* **273**: 1-8.
158. Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., *et al* (2007) The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol.* **9**: 1089-1097.
159. Mnaimneh, S., Davierwala, A.P., Haynes, J., Moffat, J., Peng, W.T., Zhang, W., *et al* (2004) Exploration of essential gene functions via titratable promoter alleles. *Cell.* **118**: 31-44.
160. Mohan, K.V., Ghebrehiwet, B. and Atreya, C.D. (2002) The N-terminal conserved domain of rubella virus capsid interacts with the C-terminal region of cellular p32 and overexpression of p32 enhances the viral infectivity. *Virus Res.* **85**: 151-161.
161. Mohl, B.P. and Barr, J.N. (2009) Investigating the specificity and stoichiometry of RNA binding by the nucleocapsid protein of Bunyamwera virus. *Rna.* **15**: 391-399.
162. Morgan, E.M. and Zweerink, H.J. (1975) Characterization of transcriptase and replicase particles isolated from reovirus-infected cells. *Virology.* **68**: 455-466.
163. Morita, E. and Sundquist, W.I. (2004) Retrovirus budding. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **20**: 395-425.
164. Moseley, J.B. and Goode, B.L. (2006) The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiol Mol Biol Rev.* **70**: 605-645.
165. Nagy, P.D. (2008) Yeast as a model host to explore plant virus-host interactions. *Annu Rev Phytopathol.* **46**: 217-242.
166. Nagy, P.D. and Pogany, J. (2011) The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors. *Nat Rev Microbiol.* **10**: 137-149.
167. Nagy, P.D., Barajas, D. and Pogany, J. (2012) Host factors with regulatory roles in tombusvirus replication. *Curr Opin Virol.* **2**: 691-698.
168. Nason, E.L., Wetzel, J.D., Mukherjee, S.K., Barton, E.S., Prasad, B.V. and Dermody, T.S. (2001) A monoclonal antibody specific for reovirus outer-capsid protein sigma3 inhibits sigma1-mediated hemagglutination by steric hindrance. *J Virol.* **75**: 6625-6634.
169. Netherton, C.L. and Wileman, T. (2011) Virus factories, double membrane vesicles and viroplasm generated in animal cells. *Curr Opin Virol.* **1**: 381-387.
170. Newton, S.E., Short, N.J. and Dalgarno, L. (1981) Bunyamwera virus replication in cultured *Aedes albopictus* (mosquito) cells: establishment of a persistent viral infection. *J Virol.* **38**: 1015-1024.
171. Nibert, M.L., Schiff, L.A. and Fields, B.N. (1991) Mammalian reoviruses contain a myristoylated structural protein. *J Virol.* **65**: 1960-1967.

-
172. Nibert, M.L., Odegard, A.L., Agosto, M.A., Chandran, K. and Schiff, L.A. (2005) Putative autocleavage of reovirus $\mu 1$ protein in concert with outer-capsid disassembly and activation for membrane permeabilization. *J Mol Biol.* **345**: 461-474.
173. Nielson, K.B., Atkin, C.L. and Winge, D.R. (1985) Distinct metal-binding configurations in metallothionein. *J Biol Chem.* **260**: 5342-5350.
174. Novoa, R.R., Calderita, G., Cabezas, P., Elliott, R.M. and Risco, C. (2005a) Key Golgi factors for structural and functional maturation of bunyamwera virus. *J Virol.* **79**: 10852-10863.
175. Novoa, R.R., Calderita, G., Arranz, R., Fontana, J., Granzow, H. and Risco, C. (2005b) Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol Cell.* **97**: 147-172.
176. O'Hare, H.M., Johnsson, K. and Gautier, A. (2007) Chemical probes shed light on protein function. *Curr Opin Struct Biol.* **17**: 488-494.
177. O'Reilly, E.K., Paul, J.D. and Kao, C.C. (1997) Analysis of the interaction of viral RNA replication proteins by using the yeast two-hybrid assay. *J Virol.* **71**: 7526-7532.
178. Ogino, T., Iwama, M., Ohsawa, Y. and Mizumoto, K. (2003) Interaction of cellular tubulin with Sendai virus M protein regulates transcription of viral genome. *Biochem Biophys Res Commun.* **311**: 283-293.
179. Olson, A.J., Bricogne, G. and Harrison, S.C. (1983) Structure of tomato bushy stunt virus IV. The virus particle at 2.9 Å resolution. *J Mol Biol.* **171**: 61-93.
180. Ooms, L.S., Kobayashi, T., Dermody, T.S. and Chappell, J.D. (2010) A post-entry step in the mammalian orthoreovirus replication cycle is a determinant of cell tropism. *J Biol Chem.* **285**: 41604-41613.
181. Ooms, L.S., Jerome, W.G., Dermody, T.S. and Chappell, J.D. (2012) Reovirus replication protein $\mu 2$ influences cell tropism by promoting particle assembly within viral inclusions. *J Virol.* **86**: 10979-10987.
182. Panavas, T., Hawkins, C.M., Panaviene, Z. and Nagy, P.D. (2005a) The role of the p33:p33/p92 interaction domain in RNA replication and intracellular localization of p33 and p92 proteins of Cucumber necrosis tomosvirus. *Virology.* **338**: 81-95.
183. Panavas, T., Serviene, E., Brasher, J. and Nagy, P.D. (2005b) Yeast genome-wide screen reveals dissimilar sets of host genes affecting replication of RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**: 7326-7331.
184. Parashar, U.D., Bresee, J.S., Gentsch, J.R. and Glass, R.I. (1998) Rotavirus. *Emerg Infect Dis.* **4**: 561-570.
185. Parker, J.S., Broering, T.J., Kim, J., Higgins, D.E. and Nibert, M.L. (2002) Reovirus core protein $\mu 2$ determines the filamentous morphology of viral inclusion bodies by interacting with and stabilizing microtubules. *J Virol.* **76**: 4483-4496.
186. Pathak, K.B., Sasvari, Z. and Nagy, P.D. (2008) The host Pex19p plays a role in peroxisomal localization of tomosvirus replication proteins. *Virology.* **379**: 294-305.

187. Patton, J.T., Silvestri, L.S., Tortorici, M.A., Vasquez-Del Carpio, R. and Taraporewala, Z.F. (2006) Rotavirus genome replication and morphogenesis: role of the viroplasm. *Curr Top Microbiol Immunol.* **309**: 169-187.
188. Paul, D., Hoppe, S., Saher, G., Krijnse-Locker, J. and Bartenschlager, R. (2013) Morphological and biochemical characterization of the membranous hepatitis C virus replication compartment. *J Virol.* **87**: 10612-10627.
189. Pederson, T. and Aebi, U. (2005) Nuclear actin extends, with no contraction in sight. *Mol Biol Cell.* **16**: 5055-5060.
190. Peng, L., Ryazantsev, S., Sun, R. and Zhou, Z.H. (2010) Three-dimensional visualization of gammaherpesvirus life cycle in host cells by electron tomography. *Structure.* **18**: 47-58.
191. Perez, L., Guinea, R. and Carrasco, L. (1991) Synthesis of Semliki Forest virus RNA requires continuous lipid synthesis. *Virology.* **183**: 74-82.
192. Perlman, M. and Resh, M.D. (2006) Identification of an intracellular trafficking and assembly pathway for HIV-1 gag. *Traffic.* **7**: 731-745.
193. Pogany, J., Stork, J., Li, Z. and Nagy, P.D. (2008) In vitro assembly of the Tomato bushy stunt virus replicase requires the host Heat shock protein 70. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**: 19956-19961.
194. Poh, M.K., Shui, G., Xie, X., Shi, P.Y., Wenk, M.R. and Gu, F. (2012) U18666A, an intra-cellular cholesterol transport inhibitor, inhibits dengue virus entry and replication. *Antiviral Res.* **93**: 191-198.
195. Portela, A. and Digard, P. (2002) The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol.* **83**: 723-734.
196. Poruchynsky, M.S., Maass, D.R. and Atkinson, P.H. (1991) Calcium depletion blocks the maturation of rotavirus by altering the oligomerization of virus-encoded proteins in the ER. *J Cell Biol.* **114**: 651-656.
197. Prod'homme, D., Le Panse, S., Drugeon, G. and Jupin, I. (2001) Detection and subcellular localization of the turnip yellow mosaic virus 66K replication protein in infected cells. *Virology.* **281**: 88-101.
198. Qin, W., Luo, H., Nomura, T., Hayashi, N., Yamashita, T. and Murakami, S. (2002) Oligomeric interaction of hepatitis C virus NS5B is critical for catalytic activity of RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem.* **277**: 2132-2137.
199. Qu, F. and Morris, T.J. (2002) Efficient infection of *Nicotiana benthamiana* by Tomato bushy stunt virus is facilitated by the coat protein and maintained by p19 through suppression of gene silencing. *Mol Plant Microbe Interact.* **15**: 193-202.
200. Radtke, K., Dohner, K. and Sodeik, B. (2006) Viral interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker's guide to the cell. *Cell Microbiol.* **8**: 387-400.

-
201. Raymond, D.D., Piper, M.E., Gerrard, S.R. and Smith, J.L. (2010) Structure of the Rift Valley fever virus nucleocapsid protein reveals another architecture for RNA encapsidation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **107**: 11769-11774.
202. Raymond, D.D., Piper, M.E., Gerrard, S.R., Skinotis, G. and Smith, J.L. (2012) Phleboviruses encapsidate their genomes by sequestering RNA bases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **109**: 19208-19213.
203. Reiss, S., Rebhan, I., Backes, P., Romero-Brey, I., Erfle, H., Matula, P., *et al* (2011) Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe*. **9**: 32-45.
204. Reiter, D.M., Frierson, J.M., Halvorson, E.E., Kobayashi, T., Dermody, T.S. and Stehle, T. (2011) Crystal structure of reovirus attachment protein sigma1 in complex with sialylated oligosaccharides. *PLoS Pathog*. **7**: e1002166.
205. Risco, C. and Fernández de Castro, I. (2013) Virus morphogenesis in the cell: methods and observations. *Subcell Biochem*. **68**: 417-440.
206. Risco, C., Sanmartín-Conesa, E., Tzeng, W.P., Frey, T.K., Seybold, V. and de Groot, R.J. (2012) Specific, sensitive, high-resolution detection of protein molecules in eukaryotic cells using metal-tagging transmission electron microscopy. *Structure*. **20**: 759-766.
207. Risco, C.F.d.C., I. Sanz-Sánchez, L. Narayan, K. Grandinetti, G. Subramaniam, S. (2014) 3D Imaging of Viral Infections. *Annual Review of Virology*. **In press**.
208. Robbins, M.A., Reade, R.D. and Rochon, D.M. (1997) A cucumber necrosis virus variant deficient in fungal transmissibility contains an altered coat protein shell domain. *Virology*. **234**: 138-146.
209. Roberts, K.L. and Baines, J.D. (2010) Myosin Va enhances secretion of herpes simplex virus 1 virions and cell surface expression of viral glycoproteins. *J Virol*. **84**: 9889-9896.
210. Robinson, C.V., Sali, A. and Baumeister, W. (2007) The molecular sociology of the cell. *Nature*. **450**: 973-982.
211. Rodgers, S.E., Barton, E.S., Oberhaus, S.M., Pike, B., Gibson, C.A., Tyler, K.L. and Dermody, T.S. (1997) Reovirus-induced apoptosis of MDCK cells is not linked to viral yield and is blocked by Bcl-2. *J Virol*. **71**: 2540-2546.
212. Rojo, G., Chamorro, M., Salas, M.L., Vinuela, E., Cuezva, J.M. and Salas, J. (1998) Migration of mitochondria to viral assembly sites in African swine fever virus-infected cells. *J Virol*. **72**: 7583-7588.
213. Rojo, M., Legros, F., Chateau, D. and Lombes, A. (2002) Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci*. **115**: 1663-1674.
214. Romero-Brey, I., Merz, A., Chiramel, A., Lee, J.Y., Chlanda, P., Haselman, U., *et al* (2012) Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog*. **8**: e1003056.
-

215. Rothwell, C., Lebreton, A., Young Ng, C., Lim, J.Y., Liu, W., Vasudevan, S., *et al* (2009) Cholesterol biosynthesis modulation regulates dengue viral replication. *Virology*. **389**: 8-19.
216. Ruigrok, R.W., Crepin, T. and Kolakofsky, D. (2011) Nucleoproteins and nucleocapsids of negative-strand RNA viruses. *Curr Opin Microbiol*. **14**: 504-510.
217. Russo, M., Burgyan, J. and Martelli, G.P. (1994) Molecular biology of toombusviridae. *Adv Virus Res*. **44**: 381-428.
218. Saksena, S., Wahlman, J., Teis, D., Johnson, A.E. and Emr, S.D. (2009) Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell*. **136**: 97-109.
219. Salanueva, I.J., Novoa, R.R., Cabezas, P., Lopez-Iglesias, C., Carrascosa, J.L., Elliott, R.M. and Risco, C. (2003) Polymorphism and structural maturation of bunyamwera virus in Golgi and post-Golgi compartments. *J Virol*. **77**: 1368-1381.
220. Samsa, M.M., Mondotte, J.A., Iglesias, N.G., Assuncao-Miranda, I., Barbosa-Lima, G., Da Poian, A.T., *et al* (2009) Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog*. **5**: e1000632.
221. Schmaljohn, C.S., and Hooper, J.W. (2001) Bunyaviridae: the viruses and their replication. In *Fields of Virology*. Knipe, D.M., and Howley, P.M., Lippincott Williams and Wilkins (ed.) Philadelphia, pp. 1581-1602.
222. Schmaljohn, C.S., and Nichol, S.T. (2007) Bunyaviridae. In *Fields of Virology*. Knipe, D.H.y.H., P.H. Lippincott, Williams y Wilkins (ed.) Philadelphia, pp. 1741-1789.
223. Schmitz, G., Minkel, D.T., Gingrich, D. and Shaw, C.F., 3rd (1980) The binding of Gold(I) to metallothionein. *J Inorg Biochem*. **12**: 293-306.
224. Schoelz, J.E., Harries, P.A. and Nelson, R.S. (2011) Intracellular transport of plant viruses: finding the door out of the cell. *Mol Plant*. **4**: 813-831.
225. Scholthof, K.B., Scholthof, H.B. and Jackson, A.O. (1995) The tomato bushy stunt virus replicase proteins are coordinately expressed and membrane associated. *Virology*. **208**: 365-369.
226. Schonborn, J., Oberstrass, J., Breyel, E., Tittgen, J., Schumacher, J. and Lukacs, N. (1991) Monoclonal antibodies to double-stranded RNA as probes of RNA structure in crude nucleic acid extracts. *Nucleic Acids Res*. **19**: 2993-3000.
227. Schramm, B. and Locker, J.K. (2005) Cytoplasmic organization of POXvirus DNA replication. *Traffic*. **6**: 839-846.
228. Schwartz, M., Chen, J., Janda, M., Sullivan, M., den Boon, J. and Ahlquist, P. (2002) A positive-strand RNA virus replication complex parallels form and function of retrovirus capsids. *Mol Cell*. **9**: 505-514.
229. Sharma, M., Sasvari, Z. and Nagy, P.D. (2010) Inhibition of sterol biosynthesis reduces toombusvirus replication in yeast and plants. *J Virol*. **84**: 2270-2281.
230. Sharma, M., Sasvari, Z. and Nagy, P.D. (2011) Inhibition of phospholipid biosynthesis decreases the activity of the toombusvirus replicase and alters the subcellular localization of replication proteins. *Virology*. **415**: 141-152.

-
231. Shi, X. and Elliott, R.M. (2009) Generation and analysis of recombinant Bunyamwera orthobunyaviruses expressing V5 epitope-tagged L proteins. *J Gen Virol.* **90**: 297-306.
232. Shi, X., Brauburger, K. and Elliott, R.M. (2005) Role of N-linked glycans on bunyamwera virus glycoproteins in intracellular trafficking, protein folding, and virus infectivity. *J Virol.* **79**: 13725-13734.
233. Silhavy, D., Molnar, A., Lucioli, A., Szittya, G., Hornyik, C., Tavazza, M. and Burgyan, J. (2002) A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *Embo J.* **21**: 3070-3080.
234. Siniosoglou, S. (2009) Lipins, lipids and nuclear envelope structure. *Traffic.* **10**: 1181-1187.
235. Slagsvold, T., Pattni, K., Malerod, L. and Stenmark, H. (2006) Endosomal and non-endosomal functions of ESCRT proteins. *Trends Cell Biol.* **16**: 317-326.
236. Smithburn, K.C., Haddow, A.J. and Mahaffy, A.F. (1946) A neurotropic virus isolated from Aedes mosquitoes caught in the Semliki forest. *Am J Trop Med Hyg.* **26**: 189-208.
237. Sodeik, B., Ebersold, M.W. and Helenius, A. (1997) Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol.* **136**: 1007-1021.
238. Sosinsky, G.E., Giepmans, B.N., Deerinck, T.J., Gaietta, G.M. and Ellisman, M.H. (2007) Markers for correlated light and electron microscopy. *Methods Cell Biol.* **79**: 575-591.
239. Spagnolo, J.F., Rossignol, E., Bullitt, E. and Kirkegaard, K. (2010) Enzymatic and nonenzymatic functions of viral RNA-dependent RNA polymerases within oligomeric arrays. *Rna.* **16**: 382-393.
240. Spuul, P., Balistreri, G., Kaariainen, L. and Ahola, T. (2010) Phosphatidylinositol 3-kinase-, actin-, and microtubule-dependent transport of Semliki Forest Virus replication complexes from the plasma membrane to modified lysosomes. *J Virol.* **84**: 7543-7557.
241. Starnes, M.C. and Joklik, W.K. (1993) Reovirus protein lambda 3 is a poly(C)-dependent poly(G) polymerase. *Virology.* **193**: 356-366.
242. Steven, A.C., Heymann, J.B., Cheng, N., Trus, B.L. and Conway, J.F. (2005) Virus maturation: dynamics and mechanism of a stabilizing structural transition that leads to infectivity. *Curr Opin Struct Biol.* **15**: 227-236.
243. Stoltz, D. and Makkay, A. (2000) Co-replication of a reovirus and a polydnavirus in the ichneumonid parasitoid Hyposoter exiguae. *Virology.* **278**: 266-275.
244. Sundin, D.R., Beaty, B.J., Nathanson, N. and Gonzalez-Scarano, F. (1987) A G1 glycoprotein epitope of La Crosse virus: a determinant of infection of Aedes triseriatus. *Science.* **235**: 591-593.
-

245. Tao, Y., Farsetta, D.L., Nibert, M.L. and Harrison, S.C. (2002) RNA synthesis in a cage--structural studies of reovirus polymerase lambda3. *Cell*. **111**: 733-745.
246. Thomas, D., Blakqori, G., Wagner, V., Banholzer, M., Kessler, N., Elliott, R.M., *et al* (2004) Inhibition of RNA polymerase II phosphorylation by a viral interferon antagonist. *J Biol Chem*. **279**: 31471-31477.
247. Tolonen, N., Doglio, L., Schleich, S. and Krijnse Locker, J. (2001) Vaccinia virus DNA replication occurs in endoplasmic reticulum-enclosed cytoplasmic mini-nuclei. *Mol Biol Cell*. **12**: 2031-2046.
248. Tong AH, E.M., Parsons AB, Xu H, Bader GD, et al (2001) Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science*. **294**: 2364-2368.
249. Tunkara, A., Ignatova, M., Vinarova, M. and Runevski, N. (1984) [Immunofluorescence and electron microscopy study of bovine reovirus multiplication in cell culture]. *Vet Med Nauki*. **21**: 20-28.
250. Tyler, K.L., Squier, M.K., Rodgers, S.E., Schneider, B.E., Oberhaus, S.M., Grdina, T.A., *et al* (1995) Differences in the capacity of reovirus strains to induce apoptosis are determined by the viral attachment protein sigma 1. *J Virol*. **69**: 6972-6979.
251. Vogt, D.A., Camus, G., Herker, E., Webster, B.R., Tsou, C.L., Greene, W.C., *et al* (2013) Lipid droplet-binding protein TIP47 regulates hepatitis C Virus RNA replication through interaction with the viral NS5A protein. *PLoS Pathog*. **9**: e1003302.
252. Walter, C.T. and Barr, J.N. (2011) Recent advances in the molecular and cellular biology of bunyaviruses. *J Gen Virol*. **92**: 2467-2484.
253. Walter, C.T., Bento, D.F., Alonso, A.G. and Barr, J.N. (2011) Amino acid changes within the Bunyamwera virus nucleocapsid protein differentially affect the mRNA transcription and RNA replication activities of assembled ribonucleoprotein templates. *J Gen Virol*. **92**: 80-84.
254. Wang, Q.M., Hockman, M.A., Staschke, K., Johnson, R.B., Case, K.A., Lu, J., *et al* (2002) Oligomerization and cooperative RNA synthesis activity of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol*. **76**: 3865-3872.
255. Wang, R.Y. and Nagy, P.D. (2008) Tomato bushy stunt virus co-opts the RNA-binding function of a host metabolic enzyme for viral genomic RNA synthesis. *Cell Host Microbe*. **3**: 178-187.
256. Wang, R.Y., Stork, J. and Nagy, P.D. (2009) A key role for heat shock protein 70 in the localization and insertion of tombusvirus replication proteins to intracellular membranes. *J Virol*. **83**: 3276-3287.
257. Watret, G.E., Pringle, C.R. and Elliott, R.M. (1985) Synthesis of bunyavirus-specific proteins in a continuous cell line (XTC-2) derived from *Xenopus laevis*. *J Gen Virol*. **66** (Pt 3): 473-482.
258. Weber, F., Dunn, E.F., Bridgen, A. and Elliott, R.M. (2001) The Bunyamwera virus nonstructural protein NSs inhibits viral RNA synthesis in a minireplicon system. *Virology*. **281**: 67-74.

-
259. Weeks, S.A., Shield, W.P., Sahi, C., Craig, E.A., Rospert, S. and Miller, D.J. (2010) A targeted analysis of cellular chaperones reveals contrasting roles for heat shock protein 70 in flock house virus RNA replication. *J Virol.* **84**: 330-339.
260. Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C.K., Walther, P., *et al* (2009) Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe.* **5**: 365-375.
261. Westaway, E.G., Khromykh, A.A. and Mackenzie, J.M. (1999) Nascent flavivirus RNA colocalized in situ with double-stranded RNA in stable replication complexes. *Virology.* **258**: 108-117.
262. White, K.A. and Nagy, P.D. (2004) Advances in the molecular biology of tobusviruses: gene expression, genome replication, and recombination. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **78**: 187-226.
263. Wollert, T. and Hurley, J.H. (2010) Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature.* **464**: 864-869.
264. Yamamura, Y. and Scholthof, H.B. (2005) Tomato bushy stunt virus: a resilient model system to study virus-plant interactions. *Mol Plant Pathol.* **6**: 491-502.
265. Yasukawa, K., Oshiumi, H., Takeda, M., Ishihara, N., Yanagi, Y., Seya, T., *et al* (2009) Mitofusin 2 inhibits mitochondrial antiviral signaling. *Sci Signal.* **2**: ra47.
266. Yu, G.Y., Lee, K.J., Gao, L. and Lai, M.M. (2006) Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein. *J Virol.* **80**: 6013-6023.
267. Zhang, J., Diaz, A., Mao, L., Ahlquist, P. and Wang, X. (2012) Host acyl coenzyme A binding protein regulates replication complex assembly and activity of a positive-strand RNA virus. *J Virol.* **86**: 5110-5121.
268. Zhao, H., Lindqvist, B., Garoff, H., von Bonsdorff, C.H. and Liljestrom, P. (1994) A tyrosine-based motif in the cytoplasmic domain of the alphavirus envelope protein is essential for budding. *Embo J.* **13**: 4204-4211.
269. Zhu, H., Bilgin, M., Bangham, R., Hall, D., Casamayor, A., Bertone, P., *et al* (2001) Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science.* **293**: 2101-2105.
270. Zweerink, H.J., Morgan, E.M. and Skyler, J.S. (1976) Reovirus morphogenesis: characterization of subviral particles in infected cells. *Virology.* **73**: 442-453.

Anexos



Noncanonical Role for the Host Vps4 AAA+ ATPase ESCRT Protein in the Formation of *Tomato Bushy Stunt Virus* Replicase

Daniel Barajas^{1‡}, Isabel Fernández de Castro Martín^{2‡}, Judit Pogany¹, Cristina Risco^{2*}, Peter D. Nagy^{1*}

¹ Department of Plant Pathology, University of Kentucky, Lexington, Kentucky, United States of America, ² Cell Structure Laboratory, Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Campus de Cantoblanco, Madrid, Spain

Abstract

Assembling of the membrane-bound viral replicase complexes (VRCs) consisting of viral- and host-encoded proteins is a key step during the replication of positive-stranded RNA viruses in the infected cells. Previous genome-wide screens with *Tomato bushy stunt* tombusvirus (TBSV) in a yeast model host have revealed the involvement of eleven cellular ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport) proteins in viral replication. The ESCRT proteins are involved in endosomal sorting of cellular membrane proteins by forming multiprotein complexes, deforming membranes away from the cytosol and, ultimately, pinching off vesicles into the lumen of the endosomes. In this paper, we show an unexpected key role for the conserved Vps4p AAA+ ATPase, whose canonical function is to disassemble the ESCRT complexes and recycle them from the membranes back to the cytosol. We find that the tombusvirus p33 replication protein interacts with Vps4p and three ESCRT-III proteins. Interestingly, Vps4p is recruited to become a permanent component of the VRCs as shown by co-purification assays and immuno-EM. Vps4p is co-localized with the viral dsRNA and contacts the viral (+)RNA in the intracellular membrane. Deletion of Vps4p in yeast leads to the formation of crescent-like membrane structures instead of the characteristic spherule and vesicle-like structures. The *in vitro* assembled tombusvirus replicase based on cell-free extracts (CFE) from *vps4Δ* yeast is highly nuclease sensitive, in contrast with the nuclease insensitive replicase in wt CFE. These data suggest that the role of Vps4p and the ESCRT machinery is to aid building the membrane-bound VRCs, which become nuclease-insensitive to avoid the recognition by the host antiviral surveillance system and the destruction of the viral RNA. Other (+)RNA viruses of plants and animals might also subvert Vps4p and the ESCRT machinery for formation of VRCs, which require membrane deformation and spherule formation.

Citation: Barajas D, Martín IFdC, Pogany J, Risco C, Nagy PD (2014) Noncanonical Role for the Host Vps4 AAA+ ATPase ESCRT Protein in the Formation of *Tomato Bushy Stunt Virus* Replicase. PLoS Pathog 10(4): e1004087. doi:10.1371/journal.ppat.1004087

Editor: Shou-Wei Ding, University of California Riverside, United States of America

Received: January 14, 2014; **Accepted:** March 7, 2014; **Published:** April 24, 2014

Copyright: © 2014 Barajas et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research was supported by NSF (MCB 1122039) for PDN, and an FPI Program fellowship for IFdCM, and research grants BIO2009-07255 and BIO2012-33314 from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness for CR. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: crisco@cnb.csic.es (CR); pdnagy2@uky.edu (PDN)

‡ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Plus-stranded (+)RNA viruses replicate by assembling membrane-bound viral replicase complexes (VRCs) consisting of viral- and host-coded proteins in combination with the viral RNA template in the infected cells. Although major progress has recently been made in understanding the functions of the viral replication proteins, including the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and auxiliary replication proteins, the contribution of many host proteins to VRC assembly is far from complete [1–7]. The host proteins contributing to VRC assembly likely include translation factors, protein chaperones, RNA-modifying enzymes, and cellular proteins involved in lipid biosynthesis [8–14]. Other host proteins, such as the ESCRT proteins, reticulons and amphiphysins could be involved in membrane deformation occurring during VRC assembly [15–17]. However, the actual functions of the majority of the identified host proteins involved in VRC assembly have not been fully revealed.

To assemble their VRCs, RNA viruses take control of cell membranes by interfering with intracellular lipid metabolism, protein regulation, targeting and transport [7,18]. Viral polymerases of many (+)RNA viruses interact with membranes and build functional VRCs in spherules that are single-membrane vesicles with a narrow opening to the cytosol. Spherules form as invaginations in a variety of cell organelles [7,18,19]. Tubulovesicular cubic membranes, double membrane vesicles (DMV) and planar oligomeric arrays are some other classes of membranous structures that can harbor VRCs as documented in the literature [18].

TBSV is a small (+)RNA virus that has recently emerged as a model virus to study virus replication, recombination, and virus-host interactions using yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a model host [7,20–23]. Several systematic genome-wide screens and global proteomics approaches have led to the identification of ~500 host proteins/genes that interacted with the viral replication proteins or affected TBSV replication and recombination [9,11,24–32]. Subsequent detailed analysis revealed the functions of the two

Author Summary

Replication of positive-stranded RNA viruses depends on recruitment of host proteins and cellular membranes to assemble the viral replicase complexes. Tombusviruses, small RNA viruses of plants, co-opt the cellular ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport) proteins to facilitate replicase assembly on the peroxisomal membranes. The authors show a surprising role for the ESCRT-associated Vps4p AAA+ ATPase during tombusvirus replication. They show that Vps4p is recruited to and becomes a permanent member of the replicase complex through its interaction with the viral replication proteins. Also, EM and immuno-EM studies reveal that Vps4p is required for the formation of single-membrane vesicle-like structures, called spherules, which represent the sites of tombusvirus replication. The authors propose that Vps4p and other ESCRT proteins are required for membrane deformation and replicase assembly.

viral replication proteins (i.e., p33 and p92^{pol}), the viral RNA, the host heat shock protein 70 (Hsp70) and the eukaryotic elongation factor 1A (eEF1A), sterols and phospholipids in the assembly of the tombusvirus VRCs [30,31,33–41]. Hsp70 and eEF1A proteins have been shown to bind to the viral replication proteins [1,33,42]. The auxiliary p33 replication protein, which is an RNA chaperone, recruits the TBSV (+)RNA to the site of replication, which is the cytosolic surface of peroxisomal membranes [43–48]. The RdRp protein p92^{pol} binds to the essential p33 replication protein that is required for assembling the functional VRC [22,34,45,49,50].

Interestingly, the genome-wide screens and a proteome-wide over-expression approach for host factors affecting TBSV replication in yeast [9,11,26] have led to the identification of 11 ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport) proteins involved in multivesicular body (MVB)/endosome pathway [51,52]. The identified host proteins included Vps27p (ESCRT-0 complex); Vps23p and Vps28p (ESCRT-I complex), Vps25p and Vps36p (ESCRT-II complex); Snf7p and Vps24p (ESCRT-III complex); Doa4p ubiquitin isopeptidase, Did2p having Doa4p-related function; Bro1p ESCRT-associated protein and Vps4p AAA+ ATPase [9]. The identification of ESCRT proteins led to a model that tombusvirus replication depends on hijacking of ESCRT proteins to the peroxisomal membrane. It has been suggested that the protection of the viral RNA is compromised within the VRC assembled in the absence of cellular ESCRT proteins. Altogether, the formation of membranous spherule-like replication structures in infected cells might require co-opted ESCRT proteins. However, the actual functions of the subverted ESCRT proteins in TBSV replication are currently unknown.

A set of 20–30 ESCRT proteins is important for the endosomal/multivesicular body (MVB) protein-sorting pathway in eukaryotic cells, which down-regulates plasma membrane proteins via endocytosis; and sorts newly synthesized membrane proteins from trans-Golgi vesicles to the endosome, lysosome or the plasma membrane [53–55]. The ESCRT proteins are involved in membrane invagination and vesicle formation during the MVB pathway. Defects in the MVB pathway can cause serious diseases, including cancer, early embryonic lethality and defect in growth control [53–56]. Also, enveloped retroviruses (such as HIV), (+) and (–)RNA viruses (such as filo-, arena-, rhabdo- and paramyxoviruses) redirect cellular ESCRT proteins to the plasma membrane, leading to budding and fission of the viral particles from infected cells [51,52].

The MVB pathway starts with the recognition of monoubiquitinated cargo proteins in the endosome by Vps27p (ESCRT-0 complex), which serves as a signal for proteins to be sorted into membrane microdomains of late endosomes [54–57]. Vps27p in turn recruits Vps23-containing ESCRT-I complex and then the ESCRT-II complex, resulting in grouping the cargo proteins together in the limiting membranes of late endosomes and deforming the membranes that leads to membrane invagination into the lumen [58,59]. Then, components of the large ESCRT-III complex are recruited from the cytosol, followed by sequential assembly of ESCRT-III monomers into helical lattice on the membrane that leads to the scission of the neck of the invaginated membrane, giving rise to vesicle budding into the lumen of endosome and to MVB formation [60,61]. Then, Vps4p recycles the ESCRT proteins, whereas Doa4p recycles the ubiquitin, leading to budding of multiple small vesicles into the lumen [57].

The ESCRT-III and the Vps4p AAA+ ATPase together comprise a conserved membrane scission machinery. The ATP-dependent function of Vps4p is to disassemble and remove the ESCRT-III components from the membranes (i.e., recycling them back to the cytosol) [59,62]. Vps4p is a member of the AAA+ ATPase family, which uses ATP to remodel macromolecular structures in various biological processes, such as protein disaggregation, microtubule severing and membrane fusion. The N-terminal part of Vps4p, termed MIT domain, binds to the ESCRT-III components, while the ATPase domain is involved in ATP hydrolysis. Vps4p is present as an inactive dimer in the cytosol and during activation, Vps4p likely forms a dodecamer with two parallel rings and the ESCRT-III components are likely pulled across the central hole of these rings during the Vps4p-driven recycling event [62].

Our previous works have demonstrated that tombusviruses co-opt selected components of the cellular ESCRT machinery for replication via interaction of the p33 replication protein with Vps23p (similar to Tsg101 in mammals) and Bro1p (ALIX) [15,63]. The recruitment of these cellular ESCRT proteins to the sites of tombusvirus replication is assumed to lead to the sequential recruitment of additional selected ESCRT factors, such as ESCRT-III and Vps4p AAA+ ATPase. Indeed, in the absence of these cellular factors in yeast or the expression of dominant negative versions of these proteins in *N. benthamiana* host plant, tombusvirus replication is decreased by 10-to-20-fold [15,63]. Based on the known functions of the ESCRT proteins, it was suggested that the ESCRT proteins are recruited by TBSV to aid the formation of VRCs, which require membrane deformation to induce spherule-like structures. However, the presented data do not explain how the “neck” of the spherule-like replication structure is stabilized (to maintain an opening towards the cytosol) and why the recruitment of ESCRT factors does not lead to enclosure of the replicase complex (i.e., the VRCs are not converted rapidly into vesicles via scission of the necks of the spherules that bud inside the peroxisomes). The latter event is predicted if TBSV would take advantage of the canonical functions of the ESCRT proteins, which always result in budding of the newly formed vesicles away from the cytosol [57,59].

In this paper, we identify Vps4p AAA+ ATPase as a major host factor in TBSV replication. We show that the p33 replication protein interacts with Vps4p and three other ESCRT-III proteins. Surprisingly, we find that Vps4p is a permanent member of the tombusvirus VRCs and it also interacts with the viral RNA. EM images revealed that Vps4p is localized in a compartment also containing the viral double-stranded (ds)RNA. Altogether, we propose that the interaction of p33 and Vps4p is critical for spherule formation and efficient tombusvirus replication. These

data are consistent with the model that TBSV co-opts ESCRT proteins for its replication and these ESCRT proteins play noncanonical functions in aiding VRC formation and TBSV replication.

Results

Vps4p AAA+ ATPase is a component of the tombusvirus replicase

The formation of spherule-like structures during TBSV replication on the peroxisomal membrane surfaces and the effect of various ESCRT proteins on tombusvirus replication [15,48], suggest that some of the co-opted cellular ESCRT proteins might play noncanonical functions. To gain insights into the functions of the co-opted ESCRT proteins during tombusvirus replication, first we analyzed if p33 replication protein could interact with ESCRT-III components or the Vps4p AAA+ ATPase. The split-ubiquitin-based yeast two-hybrid assay (membrane-based MYTH assay) between the tombusvirus p33 and the yeast ESCRT-III components or Vps4p revealed strong interaction between p33 and Vps4p (Fig. 1A). This is surprising, since Vps4p is known to interact with the ESCRT-III components to recycle them from the endosome [59,62], while recycling of the peroxisome-bound p33 to the cytosol is unlikely to happen and not yet documented. In addition, we observed good interactions between p33 and Vps2p, Vps20p, and Vps24p ESCRT-III factors (Fig. 1A). The most abundant ESCRT-III factor, namely Snf7p, whose deletion greatly affected TBSV replication [15], and Did2p interacted only weakly with p33 (Fig. 1A). Affinity-based co-purification experiments from the membrane fraction of yeast confirmed that Vps4p strongly interacted with p33 (Fig. 1B, lane 12), while the interaction of Vps2p and Vps20p with p33 was also detectable (Fig. 1B, lanes 2 and 8). Unlike in the MYTH assay, the co-purification experiments suggested strong interaction between p33 and Vps24p (Fig. 1B, lane 4). We could not co-purify Snf7p and Did2p with p33 (Fig. 1B, lanes 6 and 10). Altogether, Vps4p showed consistently the strongest interaction with the p33 replication protein and this interaction is unexpected and could play a direct role in TBSV replication.

To confirm that the interaction between the viral replication protein and Vps4p also occurs in plants, we co-expressed the *Arabidopsis thaliana* AtVps4 in *Nicotiana benthamiana* leaves together with the FLAG-tagged tombusvirus p33 replication protein (Fig. 1C). After isolation of the membrane-bound replicase from the leaves and solubilization of the membrane fraction with nonionic detergent, we FLAG-affinity purified p33, followed by Western blotting. This approach revealed co-purification of AtVps4 with the tombusvirus p33 (Fig. 1C, lane 1), while AtVps4 was missing after purification in the sample prepared from leaves lacking p33 (lane 2). Thus, similar to yeast, the tombusvirus p33 replication protein also interacts with AtVps4 in plant leaves, suggesting subversion of Vps4 for viral activities.

Since Vps4p showed strong interaction with the tombusvirus p33 replication protein, we tested if Vps4p is part of the tombusvirus VRC. Interestingly, the affinity-purified tombusvirus replicase contained Vps4p (Fig. 2A, lane 2 versus 1). This finding highlights the possibility that Vps4p is a permanent component of the VRC (i.e., not rapidly recycled), such as Hsp70 [40]. To test this, we added cyclohexamide to yeast to prevent new p33 and p92^{pol} translation, thus formation of new VRCs. Then, we measured the level of Vps4p in the affinity-purified replicase at various time points to study if Vps4p is released from the VRCs. As a control, we used Ssa1p Hsp70, whose amount did not change within 150 min, confirming that Ssa1p remained stably associated

with the existing tombusvirus VRCs (Fig. 2B, lanes 10–12). In contrast, the amount of Pex19p peroxisomal shuttle protein, which is involved in the delivery of p33 and p92^{pol} to the peroxisomes [64] before its getting recycled to the cytosol, decreased by 60% after 150 min of incubation in the presence of cyclohexamide (Fig. 2B, lanes 2–4). Interestingly, the amount of Vps4p did not change significantly in the affinity-purified replicase preparations during this time period (Fig. 2B, lanes 6–8), suggesting that Vps4p is likely a permanent component of the tombusvirus VRCs. Obviously, this is different from the canonical role of Vps4p, which is quickly recycled from the endosomal membranes to the cytosol after the disassembly of the endosome-bound ESCRT-III structures [59,62]. Additionally, the N-terminally truncated Vps4p carrying the ATPase domain, but lacking the MIT domain, which is responsible for interaction with the ESCRT-III proteins, was recruited to the VRCs (Fig. 2A, lane 4), suggesting unique interaction between p33 and Vps4p.

Binding of Vps4p to the p33 replication protein involves both the MIT and ATPase domains

To map the binding sites in Vps4p, we used the split ubiquitin assay that revealed that the N-terminal MIT domain, which binds to the ESCRT-III proteins [59,62], bound efficiently to the full-length p33 (construct 1–100 versus the full-length Vps4 construct 1–437, Fig. 3A). We also observed weaker, but substantial binding between the C-terminal ATPase domain and p33 (Fig. 3A). We confirmed the interaction using the C-terminal ATPase domain and compared with the full-length Vps4p in a pull down assay with p33 (Vps4-AMIT, Fig. 3B). The interaction between the ATPase domain and p33 is not abolished by addition of ATP (not shown). Overall, the binding of p33 to Vps4p is different from the binding between Vps4p and the cellular ESCRT-III components that target only the MIT domain and leads to the Vps4p-driven recycling of the ESCRT-III components from the membranes back to the cytosol. We suggest that the unique interaction between the p33 and Vps4p subverts Vps4p for viral replication, leading to association of Vps4p with the membrane-bound replicase, and likely altering the canonical function of Vps4p.

Detailed mapping of p33 sites interacting with the Vps4p or the ATPase domain revealed that the very C-terminus of p33, which contains the p33:p33/p92 interaction sites, is involved in binding to Vps4p (Fig. 3C–F). Binding of the ATPase domain of Vps4p to p33 mostly overlaps with that of the full-length Vps4p in this assay. Altogether, the binding between Vps4p and p33 involves unique interactions that will require high-resolution structural studies.

Vps4p co-localizes with the viral double-stranded RNA in yeast cells replicating TBSV RNA

We have developed an EM-based assay to visualize the tombusvirus-induced spherule-like structures in yeast, which are known to form in infected plant tissues [15,48]. EM images revealed the presence of single-membrane vesicle-like structures of ~25–50 nm (Fig. 4A–C) that were missing in wt yeast not expressing the tombusvirus replication proteins (Fig. S1A–B). These vesicles likely represent the spherules seen in TBSV-infected plant tissues [15].

To show if Vps4p is localized to the tombusvirus VRCs, we used immuno-gold EM of yeast cells co-expressing HA-tagged Vps4p, and MT (Metal-binding protein metallothionein)-tagged p33 that was visualized by Metal-Tagging Transmission Electron Microscopy (METTEM) [65] and replicating the TBSV repRNA, which was detected through using a dsRNA-specific antibody [65] (Fig. 4D–G). These samples were processed in the absence of

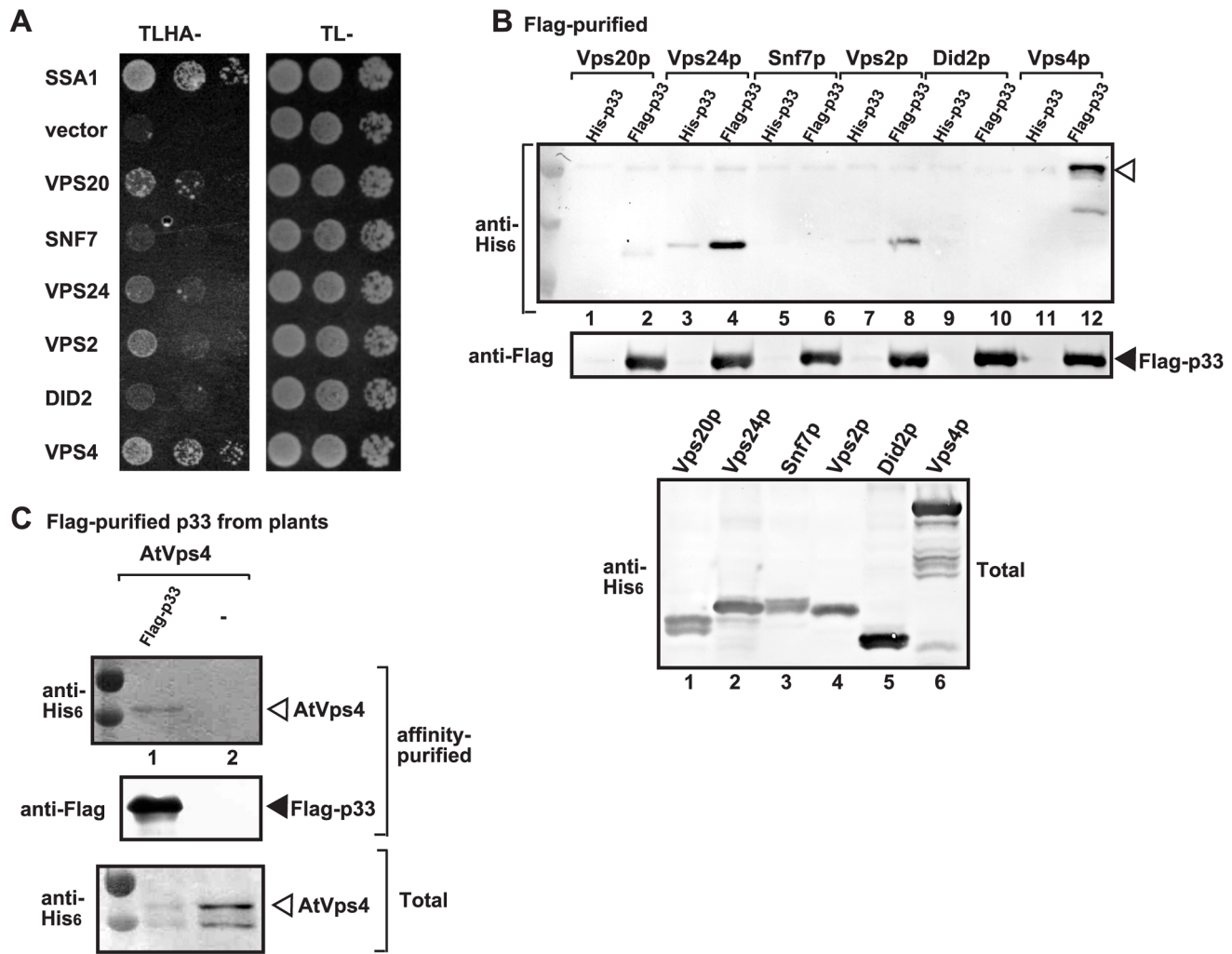


Figure 1. Interaction between p33 replication protein and Vps4p AAA+ ATPase and ESCRT-III proteins. (A) The split ubiquitin assay was used to test binding between p33 and Vps4p and the shown ESCRT-III proteins in yeast. The bait p33 was co-expressed with the shown prey proteins. SSA1 (HSP70 chaperone), and the empty prey vector (NubG) were used as positive and negative controls, respectively. (B) Co-purification of Vps4p and the shown ESCRT-III proteins with the p33 replication protein. Top panel: Western blot analysis of co-purified His₆-tagged cellular proteins with Flag-affinity purified p33 from solubilized membrane fraction from yeast cells. Vps4p and the ESCRT-III proteins were detected with anti-His antibody. The negative control was His₆-tagged p33 purified from yeast extracts using a FLAG-affinity column. Middle panel: Western blot of purified Flag-p33 detected with anti-FLAG antibody. Bottom panel: Western blot of His₆-tagged Vps4p and the ESCRT-III proteins in the total yeast extracts using anti-His antibody. (C) Co-purification of AtVps4 with the tombusvirus p33 replication protein. His₆-AtVps4, p33-FLAG and p19 (suppressor of gene silencing) were co-expressed from pGD plasmids introduced by co-agro-infiltration of *N. benthamiana* leaves. Top panel: Western blot analysis of co-purified His₆-tagged cellular AtVps4 with Flag-affinity purified FLAG-p33 (derived from the closely-related cucumber necrosis virus) from membrane fraction. AtVps4 was detected with anti-His antibody. The negative control was purified from yeast extracts using a FLAG-affinity column. Middle panel: Western blot of purified p33-FLAG detected with anti-FLAG antibody. Bottom panel: Western blot of His₆-AtVps4 protein in the total plant leaf extracts using anti-His antibody. The left-most lanes (not numbered) in panel B–C are protein molecular weight markers.

osmium tetroxide that would destroy most protein epitopes and would mask the 1 nm nano-clusters associated to p33-MT. We frequently observed Vps4p in the close vicinity of the dsRNA (present in the VRCs) based on using different sized gold particles for immuno-gold EM. It was difficult to detect Vps4p in the areas of the yeast cells lacking dsRNA (Fig. S2). We suggest that Vps4p is likely concentrated in the VRCs due to binding to p33, thus facilitating detection of Vps4p in yeast membranous compartments replicating TBSV.

For an adequate visualization of gold nanoclusters bound to p33-MT, cells in Fig. 4D and 4E were processed in the absence of osmium tetroxide and contrasting agents as described. Under

these conditions intracellular membranes are invisible; however, some membranes can be visualized if these ultra-thin sections are stained with uranyl acetate and lead citrate (Fig. 4G–I) (see Materials and Methods). Stained cells showed that Vps4p and the viral dsRNA were surrounded by membranes (Fig. 4G–I), supporting the model that Vps4p is part of the functional membrane-bound tombusvirus VRCs.

To enhance the visualization of Vps4p, we over-expressed His₆-MT-tagged Vps4p in yeast cells replicating TBSV repRNA. This approach facilitated the frequent observation of Vps4p in the close vicinity of the TBSV dsRNA by immuno-gold EM (Fig. 5). Interestingly, the spherule-containing membranous structures are

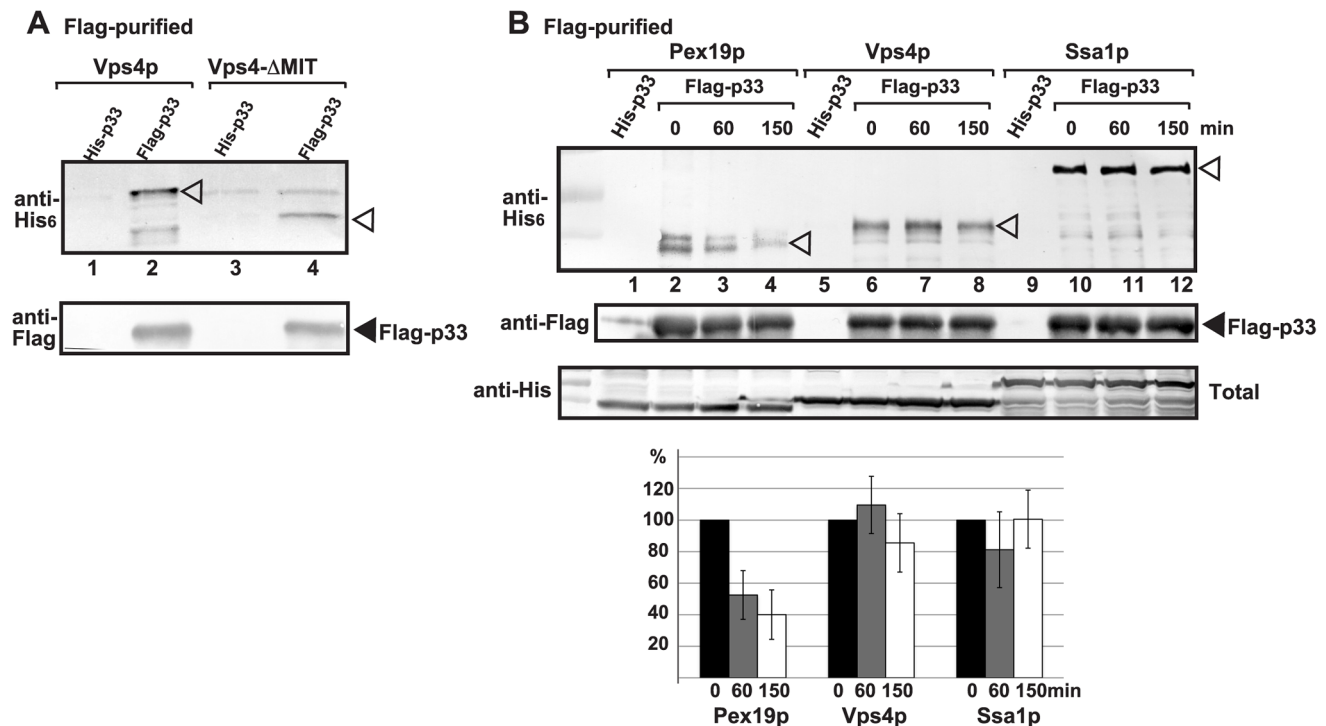


Figure 2. Vps4p is a permanent component in the tombusvirus VRCs. (A) The VRCs present in the membrane fraction of *vps4Δ* yeast expressing Flag- or His₆-tagged p33, p92 and the DI-72 repRNA were solubilized with NP-40, followed by FLAG-affinity purification. Top panel: Western blot analysis of the co-purified His₆-tagged Vps4p or its N-terminally truncated version (carrying the ATPase domain) in the purified replicase preparations with anti-His antibody. Bottom panel: Western blot analysis of Flag-tagged p33 with anti-Flag antibody. (B) Testing the presence of cellular factors in the VRCs after blocking cellular translation by cycloheximide. Top panel: Western blot analysis shows the co-purified His₆-tagged cellular proteins with the viral replicase isolated at the shown time points. See further details in panel A. Middle panel: Western blot analysis of the purified Flag-tagged p33 with anti-Flag antibody. Bottom panel: Western blot analysis of His₆-tagged cellular proteins in the total yeast lysates with anti-His antibody. Note that “total” represents the total protein extract from yeast expressing the shown proteins. The left-most lanes (not numbered) are protein molecular weight markers. Each experiment was repeated three times.

frequently connected to form a complex compartment where Vps4p and dsRNA are clustered together (Fig. 5). Altogether, the co-localization (proximal location based on immuno-EM) of Vps4p and the tombusviral dsRNA in yeast cells suggests that Vps4p is recruited to the VRCs actively involved in TBSV RNA replication.

The viral (+)RNA co-purifies with Vps4p from yeast cells replicating TBSV RNA

If Vps4p is part of the tombusvirus VRCs, it is likely associated with the neck structure of tombusvirus-induced spherules, which is predicted to serve as exit places for the newly synthesized (+)RNA from the VRCs. Therefore, we tested if Vps4p is in contact with the tombusviral RNA. Affinity purification of Vps4p from the membrane fraction of yeast containing the tombusvirus VRCs resulted in co-purification of the TBSV (+)repRNA (Fig. 6A, lane 3). Interestingly, affinity purification of Vta1p accessory protein, which facilitates the formation of the functional Vps4p rings with ATPase function from the inactive Vps4p dimers [62], also resulted in co-purification of the TBSV (+)repRNA (Fig. 6A, lane 4). As a positive control, we also used the tombusvirus p33 replication protein (purified via FLAG-tag), which also resulted in co-purification of the TBSV (+)repRNA (Fig. 6A, lane 5). The Ssa1p Hsp70 chaperone, which is another permanent component of the tombusvirus VRCs also resulted in co-purified (+)repRNA, although in a lesser amount than p33 or Vps4p (Fig. 6A, lane 6 versus 3 and 5). The negative control (HF, a peptide sequence

containing His₆-FLAG sequence expressed from the empty expression plasmid) did not contain any detectable TBSV (+)repRNA, excluding that the viral RNA bound nonspecifically to the affinity resin or the FLAG-antibody.

We also tested the presence of (–)repRNA (which might be present in a dsRNA form within the VRCs) in the above samples. As expected, the p33 replication protein preparation contained (–)repRNA (Fig. 6A, lane 15), while Vps4p, Vta1p, Ssa1p and the negative control samples did not contain (–)repRNA (Fig. 6A). Based on these data, we suggest that the Vps4p/Vta1p complex might be in direct contact with the TBSV (+)repRNA. This contact is unlikely via p33 replication protein since both (+) and (–)repRNAs were co-purified with p33.

Vps4p is involved in the formation of nuclease-resistant tombusvirus replicase *in vitro*

To obtain evidence that Vps4p is involved in the formation of tombusvirus VRCs, we took advantage of a cell-free TBSV replication assay based on TBSV-free yeast cell-free extracts (CFE) prepared from wt or *vps4Δ* yeast [41]. The CFE supports the assembly of the VRCs when purified recombinant p33 and p92 and (+)repRNA are added. Micrococcal nuclease was also added for 15 min (after which it was inactivated) to the assay at various time points to test the nuclease-sensitivity of the viral repRNA within newly assembled membrane-bound VRCs (Fig. 7A). The CFE from wt yeast was able to assemble nuclease-insensitive VRCs in ~45–60 min (Fig. 7B, lane 5). In contrast, the VRCs

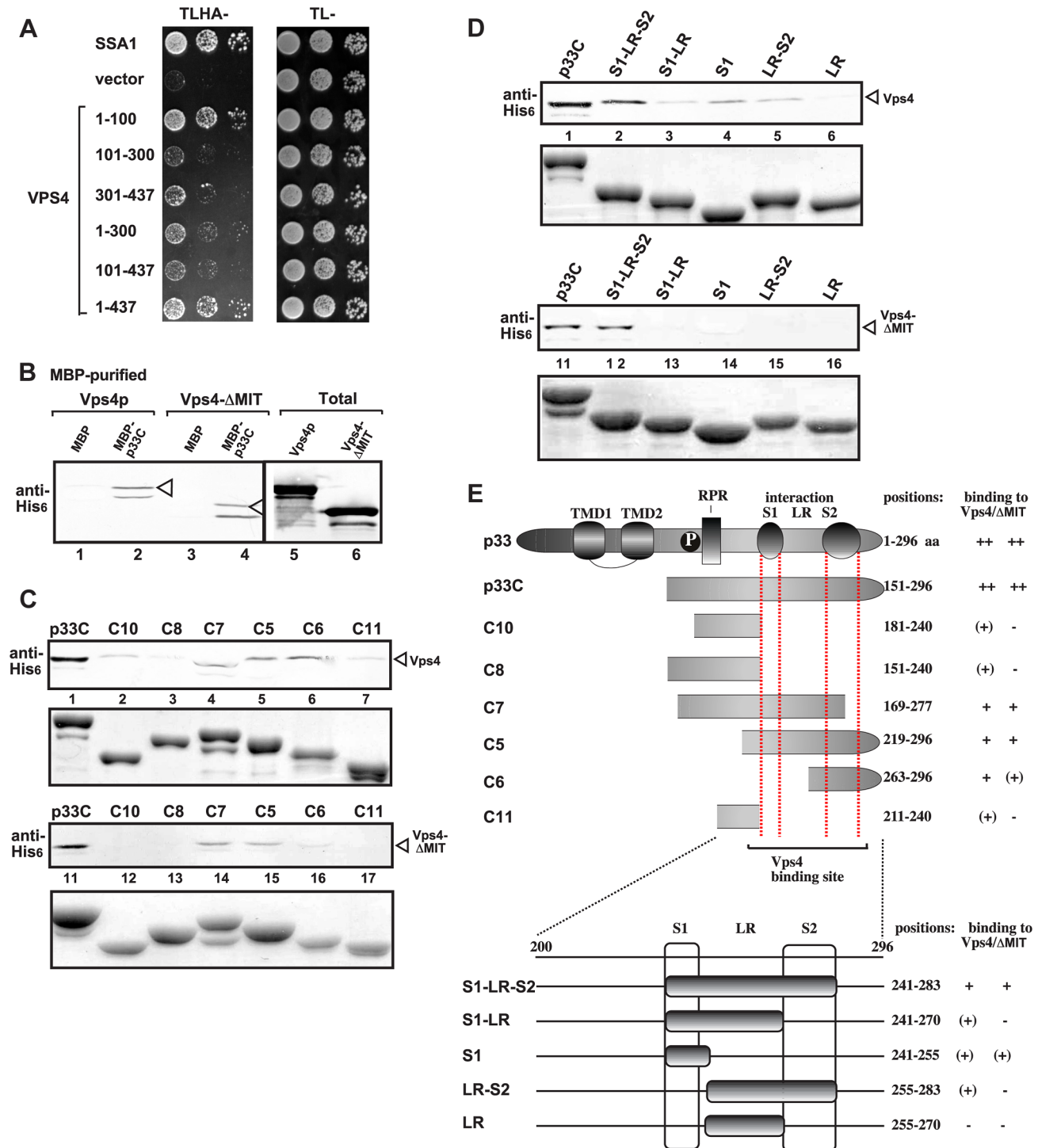


Figure 3. Interaction between Vps4p and the tombusvirus p33 replication protein. (A) Split ubiquitin MYTH assay was used to test binding between p33 and the full-length yeast Vps4p (construct 1–437) or its truncated derivatives. The bait p33 was co-expressed with the prey Vps4p protein in yeast. SSA1 (HSP70 chaperone), and the empty prey vector (NubG) were used as positive and negative controls, respectively. (B) Affinity binding assay to detect interaction between His₆-tagged Vps4p and the MBP-tagged viral p33 protein (the C-terminal portion). The MBP-tagged viral protein or MBP control produced in *E. coli* was immobilized on amylose-affinity columns. Then, His₆-tagged Vps4p or its ATPase domain expressed in *E. coli* was passed through the amylose-affinity columns with immobilized MBP-tagged proteins. The affinity-bound proteins were eluted with maltose from the columns. The eluted proteins were analyzed by Western blotting with anti-His antibody to detect the amount of His₆-tagged Vps4p specifically bound to MBP-tagged viral protein. (C–D) Affinity binding assay to map the interaction sites in p33 with His₆-tagged Vps4p. The MBP-tagged viral proteins produced in *E. coli* were immobilized on amylose-affinity columns. Then, His₆-tagged Vps4p expressed in *E. coli* was passed through the amylose-affinity columns with immobilized MBP-tagged proteins. See further details in panel B. The lower panels show the Coomassie blue-stained SDS-PAGE of the eluted MBP-tagged p33 derivatives. (E) Summary of the Vps4p binding region in p33. Schematic representation of the TBSV p33 and its truncated derivatives used in the binding assay. The various domains include: TMD, transmembrane domain; RPR, arginine-proline-rich RNA binding domain; P, phosphorylated serine and threonine; S1 and S2 subdomains involved in p33:p33/p92 interaction, LR is a linker region. doi:10.1371/journal.ppat.1004087.g003

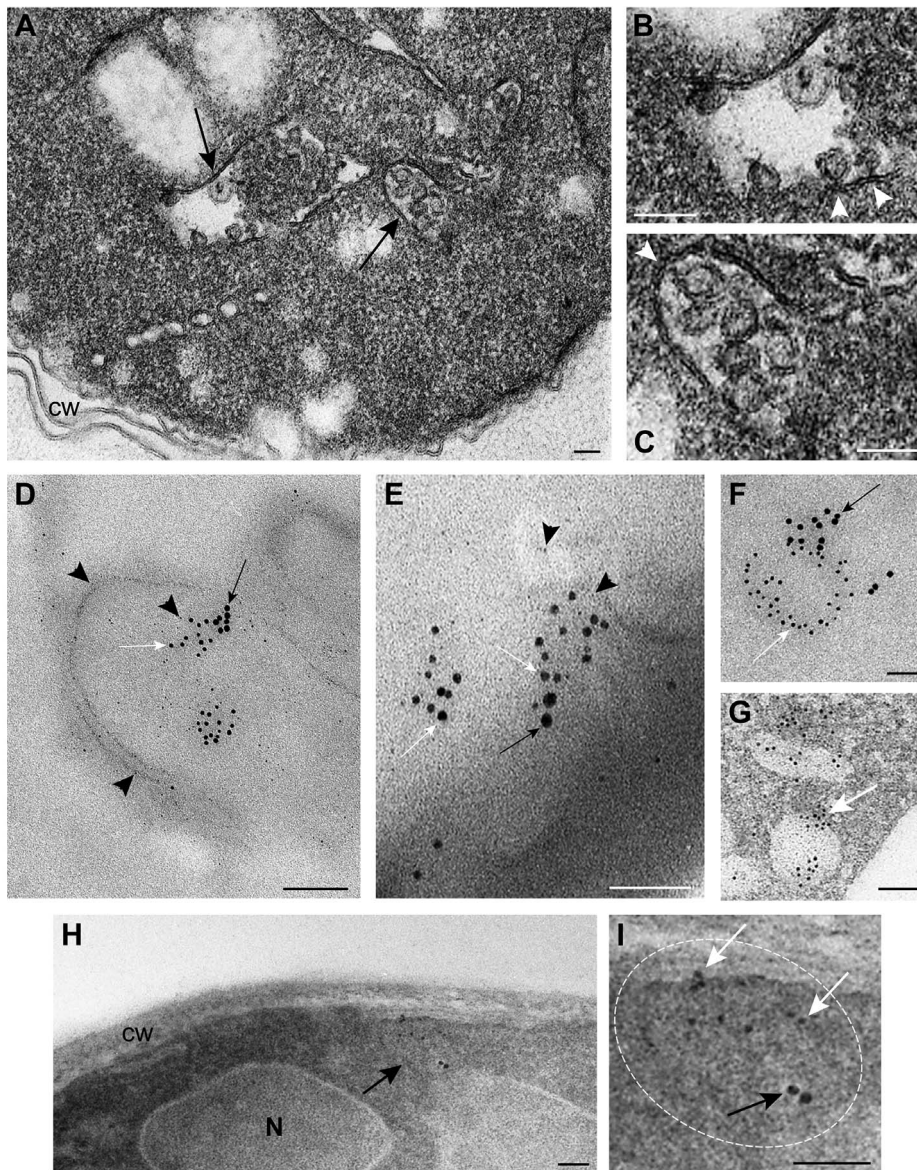


Figure 4. TBSV VRCs assemble in yeast intracellular membranes that contain p33, viral dsRNA and the ESCRT protein Vps4p. (A) TEM of a stained ultra-thin section of a yeast cell (BY4741) replicating TBSV repRNA. Characteristic spherule-like vesicles are assembled in a peripheral membranous compartment (arrows). Enlargements of the structures marked with arrows in panel A are shown in (B) and (C). Arrowheads point to contacts (necks) between the spherules and the membrane of the compartment. The structure in panel B exhibits a rather empty center while that in panel C is filled with membranes. (D) and (E) VRCs in yeast peripheral structures as studied by immunogold and METTEM. Ultra-thin sections of yeasts expressing HA-tagged Vps4p (detected with anti-HA and 10 nm gold particles, black arrows in panels D, E and F), replicating TBSV repRNA (detected with anti-dsRNA antibodies and 5 nm gold particles, white arrows in panels D, E and F) and MT-tagged p33 (~1 nm gold nano-clusters associated to MT, black arrowheads in panels D and E); sections were studied without previous staining. P33, dsRNA and Vps4p colocalize in the same peripheral compartments. (G) to (I) Ultra-thin sections of yeast cells from the same sample after staining with uranyl acetate and lead citrate. MT-p33 nanoclusters are no longer visible but cell compartments are better distinguished. Vps4p and dsRNA are clustered together in peripheral structures compatible with the spherule-containing compartment shown in panel C. (G) White arrow points to 5 nm colloidal gold particles bound to anti-dsRNA antibodies. (I) Enlargement of the membranous compartment marked with an arrow in panel H. Immunogold labeling shows co-localization of dsRNA (white arrows) and Vps4p (black arrow). Bars, 50 nm in panels A, B, C, E, F, G, H and panel I; 100 nm, in D.
doi:10.1371/journal.ppat.1004087.g004

assembled with CFE from *vps4Δ* yeast produced only small amounts of repRNA in the presence of nuclease, suggesting that Vps4p is required for the assembly of the nuclease-insensitive tombusvirus VRCs *in vitro*. The nuclease-insensitivity of the viral RNA requires cellular membranes and ATP/GTP-dependent VRC assembly and is not due to protein coating of the viral RNA, as shown previously [40,41].

Vps4p is required for the formation of spherule-like structures induced by tombusvirus replication proteins in yeast

To visualize the tombusvirus VRCs in yeast lacking Vps4p, we performed EM imaging of *vps4Δ* yeast replicating TBSV repRNA. Interestingly, unlike the characteristic tombusvirus-induced spher-

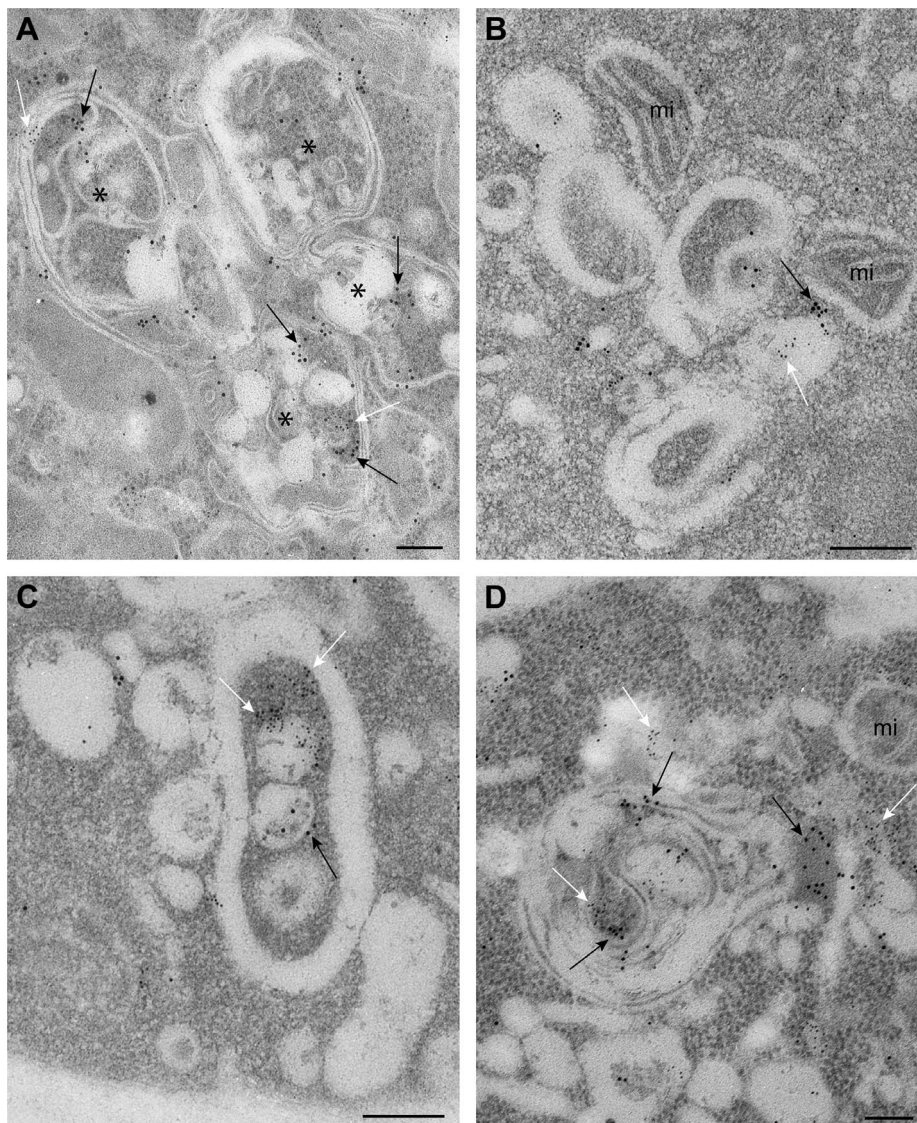


Figure 5. Complex membranous compartments containing both tombusvirus VRCs and the ESCRT protein Vps4p fused with MT and HA tags in yeast. (A) General organization of the complex membranous compartments containing the tombusvirus VRCs as seen in ultrathin sections of yeast cells (BY4741) processed by immunogold labeling and stained with uranyl acetate and lead citrate. Vps4p-MT-HA was detected with anti-HA and 10 nm gold particles (black arrows) and replicating TBSV repRNA with anti-dsRNA antibodies and 5 nm gold particles (white arrows). Asterisks mark the center of spherule-containing membranous structures that are connected to form a complex compartment where Vps4p and dsRNA are clustered together. (B) Membranous structures containing spherules and VRCs are surrounded by mitochondria (mi). Note that proximal location of mitochondria might be useful for robust virus replication that is dependent on ATP generation. This arrangement of VRCs and mitochondria are frequently observed in other viral replication platforms. (C–D) Membranous structures with spherules of ~70 nm containing both Vps4 and dsRNA. The Vps4p-MT-HA and dsRNA containing areas are connected with a complex system of membranes. Bars, 100 nm.

doi:10.1371/journal.ppat.1004087.g005

ule-like structures in wt yeast (Fig. 8A and B), the membranes from *vps4Δ* yeast expressing the p33 and p92 replication proteins and the repRNA showed different deformations (Fig. 8C and D). These crescent-shaped structures likely represent incompletely formed spherules with wide openings containing viral replicases. Similar structures (either spherules or open crescent-shaped structures) were not visible in control yeasts not expressing the viral proteins (not shown). Similar crescent-shaped membrane-structures were also visualized by EM in *vps24Δ* yeast replicating TBSV repRNA (Fig. 8E), suggesting that ESCRT-III components are also likely needed for proper deformation of membranes and VRCs formation. We interpret these data that the tombusvirus

replication proteins could not induce the formation of complete spherule-like structures in *vps4Δ* or *vps24Δ* yeasts.

To visualize the tombusvirus p33 replication protein in yeast subcellular membranes, we used Metal-Tagging Transmission Electron Microscopy (METTEM) [66] with yeast expressing MT-tagged p33 replication protein. The MT-p33 molecules were present in elongated structures in *vps4Δ* yeast (Fig. 9A), while they could form round vesicle-like structures in wt yeast (Fig. 9B). These data are consistent with the model that Vps4p is required for the formation of tombusvirus-induced spherule-like structures in yeast cells. Labeling with anti-dsRNA antibodies revealed weak to moderate signals in *vps4Δ* yeast (Fig. 9C). These results suggest

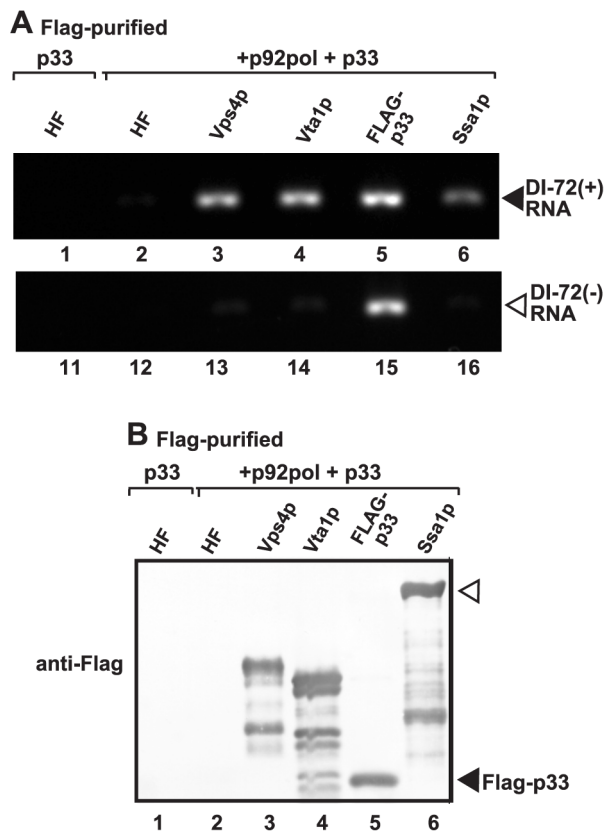


Figure 6. Co-purification of the viral (+)RNA with Vps4p. (A) The viral replicases present in the membrane fraction of yeast expressing Flag-tagged Vps4p and His₆-tagged p33, p92 and the DI-72 repRNA were solubilized with Triton-X100, followed by FLAG-affinity purification. The agarose gel image shows the RT-PCR analysis of the co-purified DI-72(+) top panel or DI-72(-) repRNA (bottom panel). Similar approach was used to detect the viral RNA with RT-PCR in samples obtained via FLAG-affinity purification through Flag-tagged Vta1p accessory factor, Flag-p33 replication protein and Flag-Ssa1p Hsp70 host factor. A His₆-Flag fusion protein served as a negative control. (B) Western blot analysis of the Flag-affinity purified proteins from the samples shown in panel A using anti-Flag antibody. doi:10.1371/journal.ppat.1004087.g006

that, in the absence of Vps4p, the abnormal VRCs are still able to support some repRNA replication. However, the level of repRNA replication is low as shown in the CFE-based replication assay (~75% less repRNA replication in this strain than in wt) [15]. Thus, replication of repRNA is inefficient in *vps4Δ* yeast and the repRNAs are less protected in wide open VRCs and much more sensitive to degradation.

Discussion

Co-opted host proteins, such as Hsp70 and eEF1A, play important roles in the assembly of the tombusvirus VRCs *in vitro*, in yeast and plant cells [30,46,63]. We have also shown previously that TBSV recruits the cellular ESCRT proteins via binding to Vps23p ESCRT-I protein and Bro1p ESCRT-accessory protein, likely leading to subversion of the cellular ESCRT machinery consisting of additional ESCRT-I and ESCRT-III components and Vps4p AAA+ ATPase [15,63]. Accordingly, deletion of not only *VPS23* or *BRO1*, but several other ESCRT genes in yeast or over-expression of dominant-negative mutants in plant leaves led to 10-to-20-fold reduction in TBSV RNA accumulation [15].

Therefore, a model was proposed that the cellular ESCRT proteins are involved in membrane bending/invagination and viral spherule formation during the assembly of the membrane-bound tombusvirus replicase complexes. However, the recruitment of the ESCRT machinery to the membrane is expected to lead to pinching off the vesicle (scission of the membrane and closure of the neck structure) into the lumen of the organelle as shown during the virion budding of HIV or MVB formation in the cell [57–59]. Formation of closed vesicles inside the peroxisomes (if pinching off the spherule would take place, sending the newly formed vesicle into the organelle lumen) should be a problem for tombusviruses. This is because the closed replication vesicles inside the peroxisomes would be deprived from accessing ribonucleotides needed for robust viral RNA synthesis from the cytosol and also face difficulties to release the newly made (+)RNA progeny back to the cytosol for additional viral processes, such as new rounds of translation and replication, cell-to-cell movement and encapsidation. Therefore, it is more plausible that tombusviruses halt the membrane budding process into the organelle lumen and stabilize the neck structure as schematically shown in Fig. 10A. Accordingly, the spherule-like structures could be visualized in tombusvirus infected plant tissues [15,48] or in yeast (this work). These spherules could have controlled communication with the cytosol [19].

But how the neck of the spherules could be stabilized to prevent the formation of luminal vesicles containing trapped VRCs inside the vesicles? Based on the results from this work, we propose that tombusviruses recruit Vps4p and incorporate it as a permanent component of the VRCs. The supporting data include: (i) the strong binding between the p33 replication protein and Vps4p (Fig. 1); (ii) co-purification of p33 and Vps4p from yeast membrane fraction containing the VRCs (Fig. 1B–2A) or from plant leaves co-expressing the homologous AtVps4 and the tombusvirus p33 (Fig. 1C); and (iii) the extended presence of Vps4p, similar to Ssa1p Hsp70 protein, in the VRCs when new VRC formation is blocked (Fig. 2B). This is unlike the cellular Pex19p shuttle protein, which is recycled from the VRCs back to the cytosol (Fig. 2B). This is an unexpected feature of Vps4p, which should be easily recycled from the membranes after the disassembly of the membrane-bound ESCRT-III structures based on its canonical function [59]. (iv) Co-purification of the viral (+)repRNA with Vps4p from the membrane-bound VRCs (Fig. 6), suggesting that Vps4p might be in contact with the viral RNA. All the above features predict noncanonical functions of Vps4p, which has a role in disassembling and recycling membrane-bound ESCRT-III structures to the cytosol as ESCRT-III protein monomers [57–59,62].

We also found Vps4p in the close proximity of the viral dsRNA using immuno-gold EM (Figs. 4–5). The production of dsRNA likely occurs after the assembly of the VRCs, thus Vps4p is predicted to remain a component of the assembled VRCs. Interestingly, we also observed association of Vps4p with the TBSV(+)-repRNA from the membrane fraction of yeast (Fig. 6). Based on these data, we propose that one of the roles of Vps4p could be the stabilization of the neck structure of the spherule preventing scission of the membranes. Vps4p might have additional function(s), such as a role in selective release of the viral (+)repRNA progeny from the replicase during replication using the AAA+ ATPase activity of Vps4p. Additional, high resolution images will be needed to demonstrate this intriguing possibility. We also show the association of Vta1p accessory protein, which facilitates the formation of the functional Vps4p rings with ATPase function from the inactive Vps4p dimers [62], with the viral (+)repRNA (Fig. 6). Although further experiments

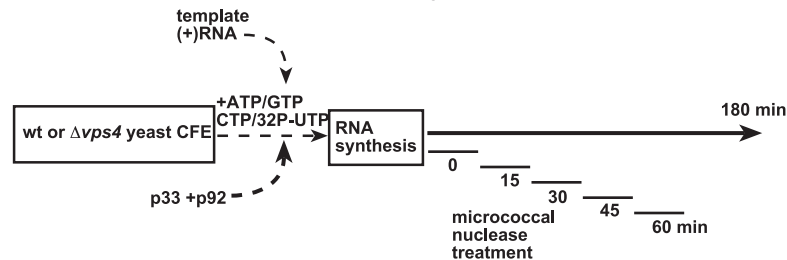
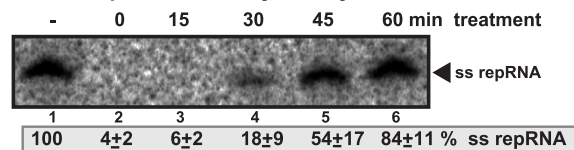
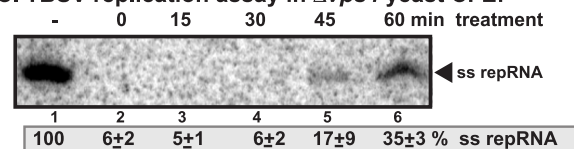
A. Scheme of the CFE replication assay:**B. TBSV replication assay in wt yeast CFE:****C. TBSV replication assay in $\Delta vps4$ yeast CFE:**

Figure 7. Increased nuclease-sensitivity of the tombusvirus replicase assembled in yeast with deletion of *VPS4* ESCRT gene. (A) Scheme of the CFE-based TBSV replication assay. CFEs prepared from wt and *vps4Δ* yeasts were programmed with DI-72(+) repRNA and purified recombinant p33 and p92^{pol} replication proteins. Micrococcal nuclease was added to the CFE for 15 minutes at various time points as shown (after which the nuclease was inactivated by EGTA). The total length of the CFE-based replication assay was 3 h for each sample. (B–C) Denaturing PAGE analysis of *in vitro* replicase activity of the CFEs from wt and *vps4Δ* yeasts. The untreated preparation was chosen as 100%. Note that the repRNA could be protected from micrococcal nuclease degradation by the membrane-associated viral replicase complex if formed correctly.
doi:10.1371/journal.ppat.1004087.g007

will be needed to address the role of Vta1p during tombusvirus replication, the intriguing possibility is that Vps4p and Vta1p are part of the tombusvirus replicase and have functional roles.

In addition to Vps4p, some ESCRT-III proteins could also be involved in the putative stabilization of the neck structure, since we find interaction between p33 replication protein and several ESCRT-III factors, such as Vps24p, Vps2p and Vps20p (Fig. 1B). The interactions between p33 and the selected ESCRT-III components could prevent the membrane scission function of ESCRT-III, especially if Vps4p is also recruited by TBSV for noncanonical activities as suggested above. Accordingly, incomplete, crescent-like membrane structures were observed in *vps24Δ* yeast (lacking the critical Vps24p ESCRT-III component), suggesting the absence of neck-like structures in these membrane deformations. However, it is possible that the ESCRT-III (and ESCRT-I) components are co-opted by tombusviruses for assisting membrane-bending around the replicase, which should occur prior to the neck formation/stabilization.

The highly conserved Vps4p likely plays a similar role in tombusvirus replication in plants. Accordingly, we co-purified AtVps4 with the tombusvirus p33 replication protein from membrane fractions from *Nicotiana benthamiana* leaves (Fig. 1C). Moreover, we have previously found that expression of a dominant-negative mutant of AtVps4 in *N. benthamiana* leaves blocked tombusvirus replication and the formation of characteristic spherules [15]. Thus, the emerging picture is that the role of Vps4p and the ESCRT machinery is to aid building membrane-bound VRCs, which are nuclease-insensitive to avoid the recognition by the host antiviral surveillance system and the destruction of the viral RNA. It is likely that other (+)RNA viruses of plants and animals could subvert Vps4p and the ESCRT

machinery for formation of VRCs, which require membrane deformation and spherule formation.

Summary

In this paper, we document a novel, noncanonical role for the Vps4p AAA+ ATPase during TBSV replication. We propose that tombusviruses not only recruit the cellular ESCRT machinery for assembling the membrane-bound VRCs, but the virus could alter the activities of Vps4p and the ESCRT-III proteins to create new functional structures (spherules acting as VRCs) and possibly new activities. The recruitment of Vps4p and additional ESCRT proteins are needed for the assembly of the replicase complex, which could help the virus evade recognition by the host defense surveillance system and/or prevent viral RNA destruction by the gene silencing machinery.

Materials and Methods**Co-purification of FLAG-p33 and host proteins**

To study co-purification of host ESCRT proteins with p33 replication protein, the yeast strain BY4741 was transformed with plasmids pGBK-FLAGp33-CUP1 (or pGBK-His33-CUP1 as control, see plasmids used in the Supplementary material) plus the pYES plasmids expressing 6×His-tagged ESCRT proteins from the *GAL1* promoter (see supplementary Material and Methods S1 for additional information). The transformed yeasts were pre-grown in SD minimal media plus 2% glucose for 20 h at 29°C, then transferred to SD minimal media plus 2% galactose for 16 h at 29°C to induce over-expression of ESCRT proteins from the *GAL1* promoter. Then, the cultures were supplemented with 50 μM CuSO₄ to induce expression of FLAG-p33 or His₆-p33

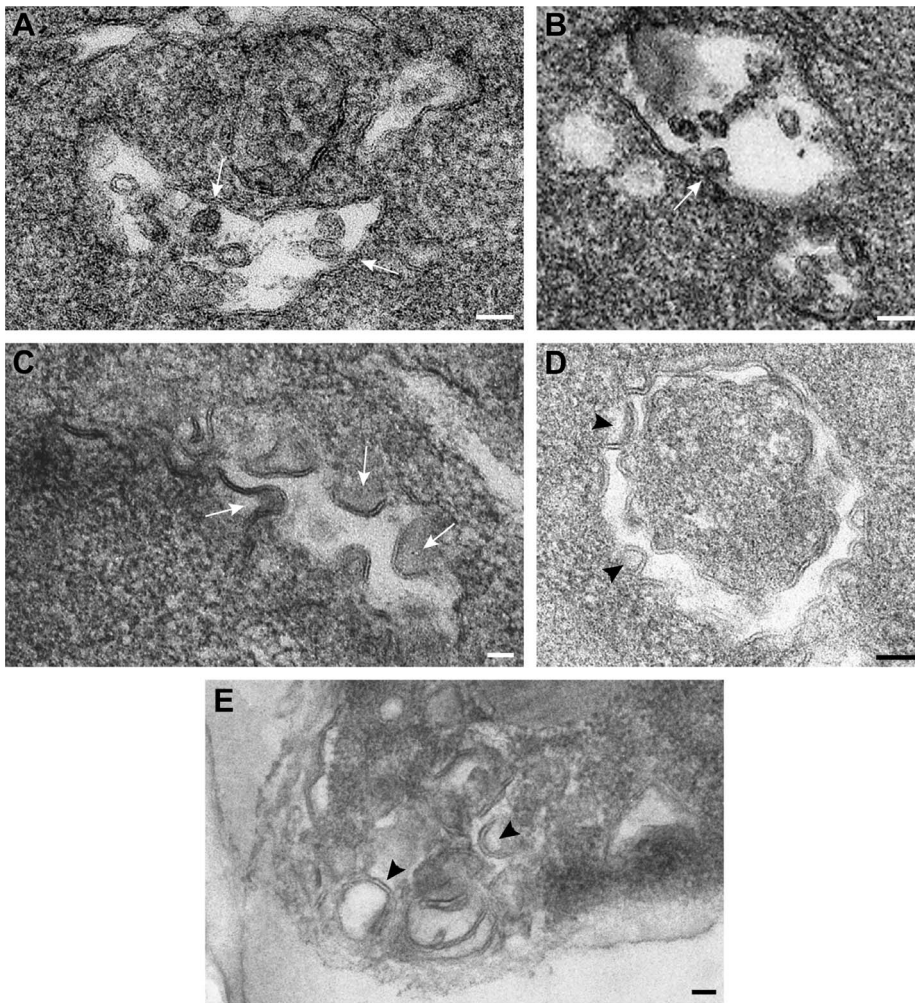


Figure 8. Vps4p is required for the formation of spherule-like structures induced by tombusvirus replication proteins in yeast. TEM of stained ultra-thin sections of yeast cells replicating TBSV repRNA and processed for ultrastructural analysis. (A) and (B) Wild type yeast cells with characteristic membranous compartments with tombusvirus-induced spherules. Arrows point to connections (neck-like constrictions) between spherules and the membrane of the intracellular compartment. (C) and (D) Peripheral membranous compartments in *vps4Δ* yeasts. Crescent-shaped membranes representing incompletely formed VRCs with wide openings face the lumen of the compartment. (E) Peripheral membranous compartments in *vps24Δ* yeasts. Crescent-shaped membrane structures face the lumen of the compartment but apparently fail to complete the spherule constriction since they have wide openings to the cytosol (white arrows in panel C, black arrowheads in panels D and E). Bars, 50 nm. doi:10.1371/journal.ppat.1004087.g008

from the *CUP1* promoter. The yeasts were collected by centrifugation after 8 h, washed in phosphate buffer saline (PBS) and then incubated in PBS plus 1% formaldehyde for 1 h on ice to cross-link proteins. Afterwards, the formaldehyde was quenched by adding glycine to a final concentration of 0.1 M. Then, yeasts were washed in PBS and processed to purify the FLAG-tagged p33 protein as described [31]. The FLAG purified fractions were eluted from the FLAG M2-agarose columns with SDS-PAGE loading buffer (without 2-mercaptoethanol). Then the eluted fractions were supplemented with 2-mercaptoethanol (5%) and boiled for 30 minutes to reverse cross-linking.

To study co-purification of His₆-Vps4p and His₆-Vps4_{101–437}, the yeast strain BY4741 was transformed with plasmids pGBK-FLAGp33-CUP1/DI72-GAL1 (or pGBK-His33-CUP1/DI72-GAL1 as control), pGAD-His92-CUP1 [67] and pYC-NT-VPS4 or pYC-NT-vps4_{101–437}. Transformed yeasts were pre-grown in SD minimal media plus 2% glucose for 20 h at 29°C, then transferred to SD minimal media plus 2% galactose and 50 μM CuSO₄ for 24 h at 29°C. The yeasts are then treated with 1%

formaldehyde as above and processed for FLAG-p33 protein purification.

To analyze the time dynamics of host proteins association with p33, BY4741 was transformed with plasmids pGBK-FLAGp33-CUP1/DI72-GAL1 (or pGBK-His33-CUP1/DI72-GAL1 as control), pGAD-His92-CUP1 [67] and either pYES-PEX19, pYES-VPS4 or pYES-SSA1. Transformed yeasts were pre-grown in SD minimal media with 2% glucose for 20 h at 29°C and then transferred to media with 2% galactose for 24 h at 29°C. The cultures were supplemented with 50 μM CuSO₄ for 2.5 h to induce expression of the viral proteins. Then cycloheximide was added (100 μg/ml) to stop protein translation and samples were taken immediately (time 0), 60 and 150 minutes afterwards. Yeast cultures were treated with formaldehyde and processed for FLAG-p33 purification as above.

Purified FLAG-p33 was detected by western blot using anti-FLAG antibody followed by anti-mouse antibody conjugated to alkaline phosphatase. Co-purified His₆-tagged host proteins were detected with anti-His antibody followed by anti-mouse antibody

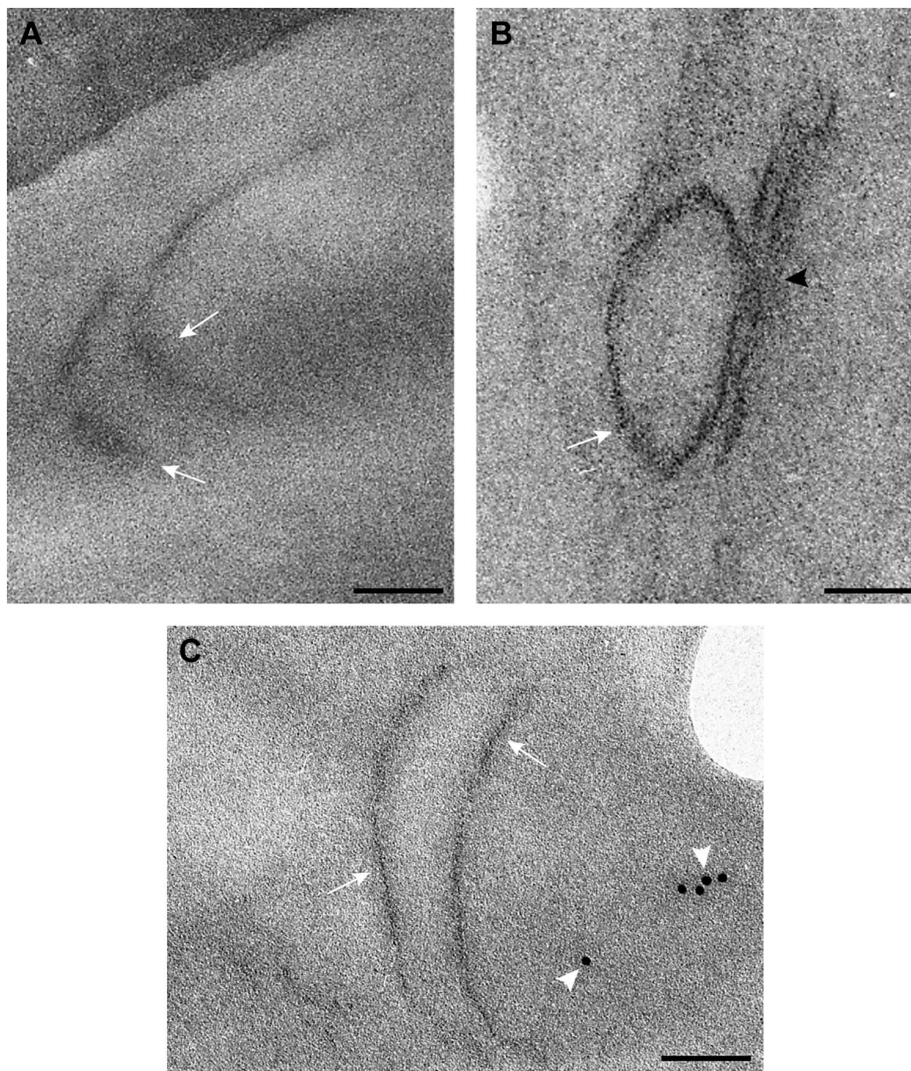


Figure 9. Detection of MT-tagged p33 replication protein in wild type and *vps4Δ* yeast. A) Electron-dense small nano-clusters associated to MT-tagged p33 reveal the presence of p33 protein molecules in elongated membrane-like structures (white arrows) of the periphery of *vps4Δ* yeast. B) In wt yeast MT-tagged p33 molecules (white arrow) concentrate in vesicle-like structures associated to peripheral membranous compartments. The black arrowhead points to the connection between the spherule and the compartment membrane. C) Immunogold labeling with anti-dsRNA antibodies and a 10 nm colloidal gold conjugate in ultra-thin sections of *vps4Δ* yeast. Weak signals associated to viral dsRNA (white arrowheads) are detected in peripheral membranes where MT-tagged p33 molecules are present. Bars, 50 nm.
doi:10.1371/journal.ppat.1004087.g009

conjugated to alkaline phosphatase. Detection was performed with NBT and BCIP.

Analysis of *in vitro* protein interactions

The pMAL c2x-derived plasmids described in the Supplementary materials were transformed into Epicurion Bl21-codon-plus (DE3)-R1L cells (Stratagene). Expression of MBP-tagged proteins was induced by IPTG as described [68]. pGEX-His-VPS4 and pGEX-His-vps4_{101–437} were also transformed into Epicurion Bl21-codon-plus (DE3)-R1L cells. Expression of GST-His₆-tagged Vps4p and Vps4_{101–437} was essentially done as described [68] with the exception that cultures were incubated at 23°C during IPTG treatment. The cells were broken by sonication as described [68]. The lysates were incubated with GST resin (Novagen) for 1 h at 4°C. The GST resin was washed four times with column buffer [68] and then incubated for 3 h at 21°C with column buffer plus 1 mM 2-mercaptoethanol + 1 mM CaCl₂ + 1 U Thrombin

(Novagen) to cleave the His₆-Vps4p and His₆-Vps4_{101–437} from the column-bound GST protein. The amylose columns containing the MBP or MBP-tagged p33 portions were then incubated with 15 µg of the purified His₆-Vps4p or His₆-Vps4_{101–437} for 1 h at 4°C. The columns were then washed five times with column buffer and the MBP-tagged proteins were eluted with column buffer plus 10 mM maltose. The MBP-tagged proteins were analyzed by SDS-PAGE electrophoresis followed by coomassie staining. Bound His₆-Vps4p or His₆-Vps4_{101–437} were detected with anti-His antibody followed by alkaline phosphatase- conjugated anti-mouse and NBT/BCIP.

Analysis of *in vivo* protein interactions by yeast membrane two-hybrid assay

The yeast membrane two-hybrid assay, based on the split-ubiquitin system (Dualsystems) has been described before [31]. The plasmid pGAD-BT2-N-His33 was co-transformed with pPR-

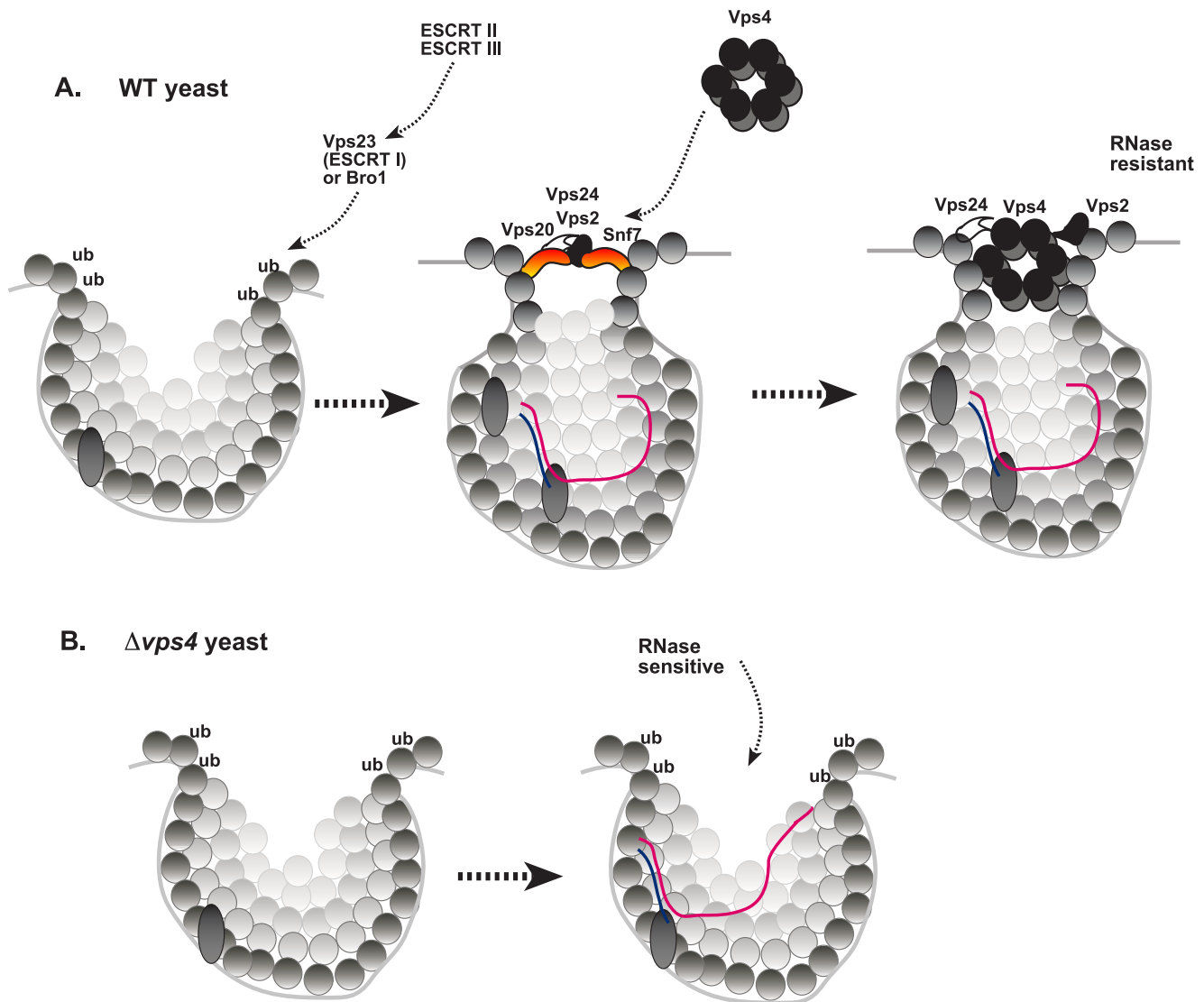


Figure 10. A model on the role of Vps4p during TBSV replication in wild type yeast and the replication defect in *vps4Δ* yeast. (A) The formation of tobusvirus-induced spherules (membrane invaginations) in the peroxisomal membranes is facilitated by the recruitment of the shown ESCRT proteins by the monoubiquitinated p33 replication protein. While the ESCRT-III components are likely recruited to the sites of replication to facilitate VRC assembly, the role of ESCRT-II factors, if any, are currently unknown. The TBSV replication model predicts that the scission of the membranous neck and the removal of the ESCRT-III proteins (Vps20p, Vps2p, Vps24p and Snf7p) by Vps4p AAA+ ATPase might be blocked by interaction with the p33 replication protein. Altogether, Vps4p becomes a permanent component of the spherule-like structure. Vps4p might also be involved in the release of the newly-made TBSV (+)RNA (not shown). (B) In the absence of Vps4p, the ESCRT-III proteins do not work properly and tobusvirus replication proteins could only form membrane invaginations with large openings that make the viral replicase complex RNase-sensitive. doi:10.1371/journal.ppat.1004087.g010

N-RE derived constructs into the reporter yeast strain NMY51. Transformed yeasts colonies were suspended in 100 μ l of water and serially diluted (10-fold) in water. 6 μ l of each dilution were spotted onto TLHA- plates, to score for interaction, or TL- plates, as growth controls.

Co-purification of host proteins and viral RNA

The yeast strain BY4741 was transformed with plasmids pGBK-His33-CUP1/DI72-GAL1, pGAD-His92-CUP1 and either pYC-HF, pYC-HF-VPS4, pYC-HF-VTA1 or pYC-HF-SSA1. Additionally yeast was transformed with pGBK-FLAGp33-CUP1/DI72-GAL1 and pGAD-His92-CUP1. Transformed yeasts were pre-grown in SD minimal media with 2% glucose for 20 h at

29°C, then transferred to SD minimal media with 2% galactose for 24 h at 29°C. The cultures were then supplemented with 50 μ M CuSO₄ for 3 h to induce expression of viral proteins. The yeasts were collected by centrifugation and subjected to formaldehyde cross-linking and FLAG purification as described above. The FLAG purified fractions, eluted in SDS-PAGE loading buffer, were treated with phenol/chloroform and ethanol precipitated to recover co-purified RNA. For detection of DI-72(+) RNA, RT reactions were done with SuperScript II (Life Technologies) and primer #22 (GTAATACGACTCACTATAGGGCTGCATT-TCTGCAATGTTCC), followed by PCR with primers #1165 (AGCGAGTAAGACAGACTCTTCA) and #927 (TAATAC-GACTCACTATAGG). For detection of DI-72(−) RNA, the

primer used for RT was #18 (GTAATACGACTCACTATAG-GAGAAAGCGAGTAAGACAG), followed by PCR with primers #1190 (GGGCTGCATTTCTGCAATG) and #927.

Analysis of replication in cell free extracts

The yeast strains BY4741 and *vps4Δ::hphNT1* were transformed with plasmids pGBK-FLAGp33-CUP1 and pGAD-FLAGp92-CUP1 [67]. Transformed yeasts were grown and cell free extracts prepared as described [49] except that the cultures were supplemented with 50 μ M CuSO₄ 1.5 h before harvesting, to induce expression of p33 and p92, and incubated at 37°C for 45 min before harvesting. Replicase reactions were carried out as described [49]. RNA protection was tested by adding 1 mM CaCl₂ and 50 ng micrococcal nuclease at selected time points followed by 15 min incubation and then inactivation of the nuclease by addition of 2.5 mM EGTA. All reactions were incubated for a total time of 3 h.

Electron microscopic studies

Yeast strains (see Supplementary materials) were pre-cultured from plated single colonies by inoculation in 2 ml of YPG (yeast extract peptone galactose) and shaking overnight at 250 rpm at 30°C. For inducing and maintaining viral replication, yeasts cells were grown for 24 h in YPG at 23°C and shaken at 250 rpm. When OD₆₀₀ was around 2, cells were collected, centrifuged for 5 min at 4000 g, resuspended in TSD reduction buffer (Tris-sulfate DTT, pH 9.4) and either chemically fixed for electron microscopy (see below) or processed for removing the cell wall and obtaining spheroplasts.

For obtaining spheroplasts, yeast cells were incubated for 10 min at room temperature and treated at 30°C with 0.1 μ g/ μ l zymolyase 20T (AMS Biotechnology) in spheroplast medium A (1 \times yeast nitrogen base, 2% (w/v) glucose, 1 \times amino acids, 1 M sorbitol, 20 mM TrisCl, pH 7.5) for 5 or 15 min, depending on the yeast strain. After zymolyase treatment, cells were centrifuged for 5 min, at 1000 g and 23°C and washed once with spheroplast medium B (1 \times yeast nitrogen base, 2% (w/v) glucose, 1 \times amino acids, 1 M sorbitol) and twice with spheroplast medium A.

For ultrastructural studies, yeast cells and spheroplasts were processed. Compared to whole yeast cells, spheroplasts are well infiltrated with fixatives and resins allowing an optimal visualization of intracellular compartments. Cells were first fixed for 20 min in suspension at room temperature with 8% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde followed by a second fixation step of 1 h at room temperature with 4% paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde in HEPES (pH 7.4); fixed cells were then processed by conventional embedding in the epoxy-resin EML-812 (Taab Laboratories) following procedures for an optimal preservation of cell endomembranes [65,69,70]. Cells were post-fixed for 1 h at 4°C with 1% osmium tetroxide and 0.8% potassium ferricyanide in water, washed with HEPES, and 40 min with 2% uranyl acetate at 4°C. During post-fixation, samples were protected from light. Cells were submitted to dehydration steps for 20 min each with increasing concentrations of acetone (50, 70, 90, and twice in 100%) at 4°C and incubated with acetone-resin (1:1) with gentle agitation at room temperature. Cells were infiltrated overnight with pure resin for 1 day and polymerized at 60°C for 3 days. Ultrathin (50–70 nm) sections were collected in 300 mesh cooper grids (G300-C3, Taab) with a plastic layer of 0.25% formvar in chloroform. Then, grids were stained for 20 min with saturated uranyl acetate and for 2 min with lead citrate following standard

procedures. Samples were studied in a Jeol JEM 1011 electron microscope operating at 100 kv.

For visualization of MT-tagged p33 in cells and immunogold labeling, cells were processed by embedding in the acrylic resin LRWhite following procedures for an adequate preservation of protein epitopes and optimal visualization of small nano-clusters [66]. Spheroplasts were incubated for 75 min with 0.2 mM HAuCl₄ (SIGMA-ALDRICH) in spheroplast medium A. This treatment builds gold nano-clusters in MT-tagged proteins allowing detection of protein molecules in cells with high sensitivity and at molecular scale resolution [66,71]. Cells were washed with spheroplast medium A before fixation with 4% paraformaldehyde and 0.2% glutaraldehyde in PHEM (20 mM PIPES, 50 mM HEPES, 20 mM EGTA and 4 mM MgCl₂, pH 6.9) (1 h at room temperature). Cells were submitted to short dehydration steps of 10 min each in increasing concentrations of ethanol (30, 50, 70, 90 and twice with 100%) at 4°C. Spheroplasts were incubated in mixtures of ethanol- LR White acrylic resin (2:1, 2:2, 1:2) with gentle agitation and protected from light and embedded in 100% resin for 24 h. Samples were polymerized for 48 h at 60°C. Ultrathin sections were collected in 300 mesh Quantifoil holey carbon grids (R 3.5/1 Cu/Rh, Quantifoil Micro Tools) and studied without staining.

For immunogold labeling sections of cells embedded in LR White acrylic resin were processed as described [70]. Briefly, sections were incubated for 6 min with 1% BSA (Bovine serum albumin) in PBS, with primary antibodies diluted in 1% BSA and with secondary antibodies conjugated with 5 or 10 nm colloidal gold particles (from BB International) and diluted in 1% BSA. Dilutions of antibodies were rabbit anti-HA 9110 from ABCAM (1:200) and mouse anti-dsRNA Mab J2 from English & Scientific Consulting (1:200). Secondary antibodies were diluted 1:40.

Supporting Information

Figure S1 TEM of stained ultra-thin sections of control BY4741 yeasts. (A–B) Independent cells, which do not express the tombusvirus replication proteins, are shown in each panel. Characteristic mitochondria (mi), Nuclei (N) and endomembranes (arrows) are distinguished but spherule-like vesicles are absent. Bars, 100 nm.
(PDF)

Figure S2 Immunogold detection of Vps4-HA in the absence of the tombusvirus replication proteins. White arrows in A and B point to 10 nm colloidal gold particles bound to anti-HA. Bars, 100 nm.
(PDF)

Materials and Methods S1 Yeast strains and plasmids. Yeast strains used for electron microscopy.
(DOC)

Acknowledgments

The authors thank to Dr. José Antonio Tercero, Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” for expert advice with yeast culture and spheroplast manipulation.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: DB IFdCM JP CR PDN. Performed the experiments: DB IFdCM JP. Analyzed the data: DB IFdCM JP CR PDN. Contributed reagents/materials/analysis tools: DB IFdCM JP. Wrote the paper: DB IFdCM JP CR PDN.

References

- Nagy PD (2008) Yeast as a model host to explore plant virus-host interactions. *Annu Rev Phytopathol* 46: 217–242.
- Nagy PD, Pogany J (2008) Multiple roles of viral replication proteins in plant RNA virus replication. *Methods Mol Biol* 451: 55–68.
- Huang YW, Hu CC, Lin NS, Hsu YH (2012) Unusual roles of host metabolic enzymes and housekeeping proteins in plant virus replication. *Curr Opin Virol* 2: 676–682.
- Shulla A, Randall G (2012) Hepatitis C virus-host interactions, replication, and viral assembly. *Curr Opin Virol* 2: 725–732.
- Mine A, Okuno T (2012) Composition of plant virus RNA replicase complexes. *Curr Opin Virol* 2: 669–675.
- Belov GA, van Kuppeveld FJ (2012) (+)RNA viruses rewire cellular pathways to build replication organelles. *Curr Opin Virol* 2: 740–747.
- Nagy PD, Pogany J (2012) The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors. *Nature Reviews Microbiology* 10: 137–149.
- Ahlquist P, Nouciry AO, Lee WM, Kushner DB, Dye BT (2003) Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J Virol* 77: 8181–8186.
- Panavas T, Serviene E, Brasher J, Nagy PD (2005) Yeast genome-wide screen reveals dissimilar sets of host genes affecting replication of RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 7326–7331.
- Cherry S, Doukas T, Armknecht S, Whelan S, Wang H, et al. (2005) Genome-wide RNAi screen reveals a specific sensitivity of IRES-containing RNA viruses to host translation inhibition. *Genes Dev* 19: 445–452.
- Jiang Y, Serviene E, Gal J, Panavas T, Nagy PD (2006) Identification of essential host factors affecting tombusvirus RNA replication based on the yeast Tet promoters Hughes Collection. *J Virol* 80: 7394–7404.
- Kushner DB, Lindenbach BD, Grzelishvili VZ, Nouciry AO, Paul SM, et al. (2003) Systematic, genome-wide identification of host genes affecting replication of a positive-strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15764–15769.
- Nouciry AO, Ahlquist P (2003) Brome mosaic virus RNA replication: revealing the role of the host in RNA virus replication. *Annu Rev Phytopathol* 41: 77–98.
- Krishnan MN, Ng A, Sukumaran B, Gilfoy FD, Uchil PD, et al. (2008) RNA interference screen for human genes associated with West Nile virus infection. *Nature* 455: 242–245.
- Barajas D, Jiang Y, Nagy PD (2009) A unique role for the host ESCRT proteins in replication of Tomato bushy stunt virus. *PLoS Pathog* 5: e1000705.
- Diaz A, Wang X, Ahlquist P (2010) Membrane-shaping host reticulon proteins play crucial roles in viral RNA replication compartment formation and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 16291–16296.
- Neuvonen M, Kazlauskas A, Martikainen M, Hinkkanen A, Ahola T, et al. (2011) SH3 domain-mediated recruitment of host cell amphiphysins by alphavirus nsP3 promotes viral RNA replication. *PLoS Pathog* 7: e1002383.
- de Castro IF, Volonte L, Risco C (2013) Virus factories: biogenesis and structural design. *Cell Microbiol* 15: 24–34.
- den Boon JA, Diaz A, Ahlquist P (2010) Cytoplasmic viral replication complexes. *Cell Host Microbe* 8: 77–85.
- Nagy PD, Pogany J (2006) Yeast as a model host to dissect functions of viral and host factors in tombusvirus replication. *Virology* 344: 211–220.
- White KA, Nagy PD (2004) Advances in the molecular biology of tombusviruses: gene expression, genome replication, and recombination. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 78: 187–226.
- Panaviene Z, Panavas T, Serva S, Nagy PD (2004) Purification of the cucumber necrosis virus replicase from yeast cells: role of coexpressed viral RNA in stimulation of replicase activity. *J Virol* 78: 8254–8263.
- Panavas T, Nagy PD (2003) Yeast as a model host to study replication and recombination of defective interfering RNA of Tomato bushy stunt virus. *Virology* 314: 315–325.
- Serviene E, Shapka N, Cheng CP, Panavas T, Phuangrat B, et al. (2005) Genome-wide screen identifies host genes affecting viral RNA recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 10545–10550.
- Serviene E, Jiang Y, Cheng CP, Baker J, Nagy PD (2006) Screening of the yeast yTHC collection identifies essential host factors affecting tombusvirus RNA recombination. *J Virol* 80: 1231–1241.
- Shah Nawaz-Ul-Rehman M, Martinez-Ochoa N, Pascal H, Sasvari Z, Herbst C, et al. (2012) Proteome-wide overexpression of host proteins for identification of factors affecting tombusvirus RNA replication: an inhibitory role of protein kinase C. *J Virol* 86: 9384–9395.
- Nagy PD (2011) The roles of host factors in tombusvirus RNA recombination. *Adv Virus Res* 81: 63–84.
- Nagy PD, Pogany J (2010) Global genomics and proteomics approaches to identify host factors as targets to induce resistance against Tomato bushy stunt virus. *Adv Virus Res* 76: 123–177.
- Mendu V, Chiu M, Barajas D, Li Z, Nagy PD (2010) Cpr1 cyclophilin and Ess1 parvulin prolyl isomerases interact with the tombusvirus replication protein and inhibit viral replication in yeast model host. *Virology* 406: 342–351.
- Li Z, Pogany J, Panavas T, Xu K, Esposito AM, et al. (2009) Translation elongation factor 1A is a component of the tombusvirus replicase complex and affects the stability of the p33 replication co-factor. *Virology* 385: 245–260.
- Li Z, Barajas D, Panavas T, Herbst DA, Nagy PD (2008) Cdc34p Ubiquitin-Conjugating Enzyme Is a Component of the Tombusvirus Replicase Complex and Ubiquitinates p33 Replication Protein. *J Virol* 82: 6911–6926.
- Shah Nawaz-Ul-Rehman M, Reddisiva Prasanth K, Baker J, Nagy PD (2013) Yeast screens for host factors in positive-strand RNA virus replication based on a library of temperature-sensitive mutants. *Methods* 59: 207–216.
- Serva S, Nagy PD (2006) Proteomics analysis of the tombusvirus replicase: Hsp70 molecular chaperone is associated with the replicase and enhances viral RNA replication. *J Virol* 80: 2162–2169.
- Pogany J, Nagy PD (2012) p33-Independent Activation of a Truncated p92 RNA-Dependent RNA Polymerase of Tomato Bushy Stunt Virus in Yeast Cell-Free Extract. *J Virol* 86: 12025–12038.
- Sharma M, Sasvari Z, Nagy PD (2011) Inhibition of phospholipid biosynthesis decreases the activity of the tombusvirus replicase and alters the subcellular localization of replication proteins. *Virology* 415: 141–152.
- Li Z, Nagy PD (2011) Diverse roles of host RNA binding proteins in RNA virus replication. *RNA Biol* 8: 305–315.
- Sharma M, Sasvari Z, Nagy PD (2010) Inhibition of sterol biosynthesis reduces tombusvirus replication in yeast and plants. *J Virol* 84: 2270–2281.
- Li Z, Pogany J, Tupman S, Esposito AM, Kinzy TG, et al. (2010) Translation elongation factor 1A facilitates the assembly of the tombusvirus replicase and stimulates minus-strand synthesis. *PLoS Pathog* 6: e1001175.
- Wang RY, Stork J, Pogany J, Nagy PD (2009) A temperature sensitive mutant of heat shock protein 70 reveals an essential role during the early steps of tombusvirus replication. *Virology* 394: 28–38.
- Wang RY, Stork J, Nagy PD (2009) A key role for heat shock protein 70 in the localization and insertion of tombusvirus replication proteins to intracellular membranes. *J Virol* 83: 3276–3287.
- Pogany J, Stork J, Li Z, Nagy PD (2008) In vitro assembly of the Tomato bushy stunt virus replicase requires the host Heat shock protein 70. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 19956–19961.
- Wang RY, Nagy PD (2008) Tomato bushy stunt virus Co-opts the RNA-Binding Function of a Host Metabolic Enzyme for Viral Genomic RNA Synthesis. *Cell Host Microbe* 3: 178–187.
- Jonczyk M, Pathak KB, Sharma M, Nagy PD (2007) Exploiting alternative subcellular location for replication: tombusvirus replication switches to the endoplasmic reticulum in the absence of peroxisomes. *Virology* 362: 320–330.
- Pogany J, White KA, Nagy PD (2005) Specific binding of tombusvirus replication protein p33 to an internal replication element in the viral RNA is essential for replication. *J Virol* 79: 4859–4869.
- Panavas T, Hawkins CM, Panaviene Z, Nagy PD (2005) The role of the p33/p33/p92 interaction domain in RNA replication and intracellular localization of p33 and p92 proteins of Cucumber necrosis tombusvirus. *Virology* 338: 81–95.
- Nagy PD, Barajas D, Pogany J (2012) Host factors with regulatory roles in tombusvirus replication. *Curr Opin Virol* 2: 685–692.
- Stork J, Kovalev N, Sasvari Z, Nagy PD (2011) RNA chaperone activity of the tombusvirus p33 replication protein facilitates initiation of RNA synthesis by the viral RdRp in vitro. *Virology* 409: 338–347.
- McCartney AW, Greenwood JS, Fabian MR, White KA, Mullen RT (2005) Localization of the tomato bushy stunt virus replication protein p33 reveals a peroxisome-to-endoplasmic reticulum sorting pathway. *Plant Cell* 17: 3513–3531.
- Pogany J, Nagy PD (2008) Authentic replication and recombination of Tomato bushy stunt virus RNA in a cell-free extract from yeast. *J Virol* 82: 5967–5980.
- Panaviene Z, Panavas T, Nagy PD (2005) Role of an internal and two 3'-terminal RNA elements in assembly of tombusvirus replicase. *J Virol* 79: 10608–10618.
- Morita E, Sundquist WI (2004) Retrovirus budding. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 395–425.
- Perlman M, Resh MD (2006) Identification of an intracellular trafficking and assembly pathway for HIV-1 gag. *Traffic* 7: 731–745.
- Slagsvold T, Pattni K, Malerod L, Stenmark H (2006) Endosomal and non-endosomal functions of ESCRT proteins. *Trends Cell Biol* 16: 317–326.
- Hurley JH, Emr SD (2006) The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 35: 277–298.
- Katzmann DJ, Odorizzi G, Emr SD (2002) Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 893–905.
- Bowers K, Stevens TH (2005) Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1744: 438–454.
- Hurley JH, Boura E, Carlson LA, Rozycki B (2010) Membrane budding. *Cell* 143: 875–887.
- Wollert T, Hurley JH (2010) Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* 464: 864–869.
- Hurley JH, Hanson PI (2010) Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 556–566.
- Wollert T, Yang D, Ren X, Lee HH, Im YJ, et al. (2009) The ESCRT machinery at a glance. *J Cell Sci* 122: 2163–2166.
- Wollert T, Wunder C, Lippincott-Schwartz J, Hurley JH (2009) Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature* 458: 172–177.
- Yang D, Hurley JH (2010) Structural role of the Vps4-Vta1 interface in ESCRT-III recycling. *Structure* 18: 976–984.

63. Barajas D, Nagy PD (2010) Ubiquitination of tombusvirus p33 replication protein plays a role in virus replication and binding to the host Vps23p ESCRT protein. *Virology* 397: 358–368.
64. Pathak KB, Sasvari Z, Nagy PD (2008) The host Pex19p plays a role in peroxisomal localization of tombusvirus replication proteins. *Virology* 379: 294–305.
65. Fontana J, Tzeng WP, Calderita G, Fraile-Ramos A, Frey TK, et al. (2007) Novel replication complex architecture in rubella replicon-transfected cells. *Cell Microbiol* 9: 875–890.
66. Risco C, Sanmartin-Conesa E, Tzeng WP, Frey TK, Seybold V, et al. (2012) Specific, sensitive, high-resolution detection of protein molecules in eukaryotic cells using metal-tagging transmission electron microscopy. *Structure* 20: 759–766.
67. Barajas D, Li Z, Nagy PD (2009) The Nedd4-type Rsp5p ubiquitin ligase inhibits tombusvirus replication by regulating degradation of the p92 replication protein and decreasing the activity of the tombusvirus replicase. *J Virol* 83: 11751–11764.
68. Rajendran KS, Nagy PD (2003) Characterization of the RNA-binding domains in the replicase proteins of tomato bushy stunt virus. *J Virol* 77: 9244–9258.
69. Fontana J, Lopez-Montero N, Elliott RM, Fernandez JJ, Risco C (2008) The unique architecture of Bunyamwera virus factories around the Golgi complex. *Cell Microbiol* 10: 2012–2028.
70. Risco C, Rodriguez JR, Lopez-Iglesias C, Carrascosa JL, Esteban M, et al. (2002) Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment membranes and vimentin filaments participate in vaccinia virus assembly. *J Virol* 76: 1839–1855.
71. Diestra E, Fontana J, Guichard P, Marco S, Risco C (2009) Visualization of proteins in intact cells with a clonable tag for electron microscopy. *J Struct Biol* 165: 157–168.



Reovirus Forms Neo-Organelles for Progeny Particle Assembly within Reorganized Cell Membranes

Isabel Fernández de Castro, Paula F. Zamora, Laura Ooms, et al.

2014. Reovirus Forms Neo-Organelles for Progeny Particle Assembly within Reorganized Cell Membranes . mBio 5(1):

doi:10.1128/mBio.00931-13.

Updated information and services can be found at:
<http://mbio.asm.org/content/5/1/e00931-13.full.html>

**SUPPLEMENTAL
MATERIAL**

<http://mbio.asm.org/content/5/1/e00931-13.full.html#SUPPLEMENTAL>

REFERENCES

This article cites 57 articles, 34 of which can be accessed free at:
<http://mbio.asm.org/content/5/1/e00931-13.full.html#ref-list-1>

CONTENT ALERTS

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), [more>>](#)

Information about commercial reprint orders: <http://mbio.asm.org/misc/reprints.xhtml>

Information about Print on Demand and other content delivery options:

<http://mbio.asm.org/misc/contentdelivery.xhtml>

To subscribe to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/subscriptions/>

RESEARCH ARTICLE

Reovirus Forms Neo-Organelles for Progeny Particle Assembly within Reorganized Cell Membranes

Isabel Fernández de Castro,^a Paula F. Zamora,^{b,c} Laura Ooms,^b José Jesús Fernández,^d Caroline M.-H. Lai,^{b,c} Bernardo A. Mainou,^{c,e} Terence S. Dermody,^{b,c,e} Cristina Risco^a

Cell Structure Laboratory, National Center for Biotechnology, National Research Council (CNB-CSIC), Campus UAM, Madrid, Spain^a; Department of Pathology, Microbiology, and Immunology, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee, USA^b; Elizabeth B. Lamb Center for Pediatric Research, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee, USA^c; Department of Macromolecular Structures, National Center for Biotechnology, National Research Council (CNB-CSIC), Campus UAM, Madrid, Spain^d; Department of Pediatrics, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee, USA^e

P.F.Z. and L.O. contributed equally to this work.

ABSTRACT Most viruses that replicate in the cytoplasm of host cells form neo-organelles that serve as sites of viral genome replication and particle assembly. These highly specialized structures concentrate viral replication proteins and nucleic acids, prevent the activation of cell-intrinsic defenses, and coordinate the release of progeny particles. Despite the importance of inclusion complexes in viral replication, there are key gaps in the knowledge of how these organelles form and mediate their functions. Reoviruses are nonenveloped, double-stranded RNA (dsRNA) viruses that serve as tractable experimental models for studies of dsRNA virus replication and pathogenesis. Following reovirus entry into cells, replication occurs in large cytoplasmic structures termed inclusions that fill with progeny virions. Reovirus inclusions are nucleated by viral nonstructural proteins, which in turn recruit viral structural proteins for genome replication and particle assembly. Components of reovirus inclusions are poorly understood, but these structures are generally thought to be devoid of membranes. We used transmission electron microscopy and three-dimensional image reconstructions to visualize reovirus inclusions in infected cells. These studies revealed that reovirus inclusions form within a membranous network. Viral inclusions contain filled and empty viral particles and microtubules and appose mitochondria and rough endoplasmic reticulum (RER). Immunofluorescence confocal microscopy analysis demonstrated that markers of the ER and ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC) codistribute with inclusions during infection, as does dsRNA. dsRNA colocalizes with the viral protein σ NS and an ERGIC marker inside inclusions. These findings suggest that cell membranes within reovirus inclusions form a scaffold to coordinate viral replication and assembly.

IMPORTANCE Viruses alter the architecture of host cells to form an intracellular environment conducive to viral replication. This step in viral infection requires the concerted action of viral and host components and is potentially vulnerable to pharmacological intervention. Reoviruses form large cytoplasmic replication sites called inclusions, which have been described as membrane-free structures. Despite the importance of inclusions in the reovirus replication cycle, little is known about their formation and composition. We used light and electron microscopy to demonstrate that reovirus inclusions are membrane-containing structures and that the endoplasmic reticulum (ER) and the ER-Golgi intermediate compartment interact closely with these viral organelles. These findings enhance our understanding of the cellular machinery usurped by viruses to form inclusion organelles and complete an infectious cycle. This information, in turn, may foster the development of antiviral drugs that impede this essential viral replication step.

Received 6 November 2013 Accepted 21 January 2014 Published 18 February 2014

Citation Fernández de Castro I, Zamora PF, Ooms L, Fernández JJ, Lai CM-H, Mainou BA, Dermody TS, Risco C. 2014. Reovirus forms neo-organelles for progeny particle assembly within reorganized cell membranes. *mBio* 5(1):e00931-13. doi:10.1128/mBio.00931-13.

Editor Anne Moscona, Weill Medical College-Cornell

Copyright © 2014 Fernández de Castro et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution-Noncommercial-ShareAlike 3.0 Unported license](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/), which permits unrestricted noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Address correspondence to Cristina Risco, crisco@cnb.csic.es, or Terence S. Dermody, terry.dermody@vanderbilt.edu.

The replication and assembly of many viruses occur in specialized intracellular compartments known as virus factories, viral inclusions, or viroplasm. These neo-organelles formed during viral infection concentrate viral replication proteins and nucleic acids, prevent the activation of cell-intrinsic defenses, and coordinate the release of progeny particles (1–3). Many RNA viruses build factories by remodeling host membranes and creating new interorganelle contacts (4). Interestingly, membrane rearrangements are induced by both enveloped and nonenveloped viruses,

suggesting that viral replication requires the physical support of cell membranes, even for those viruses that do not incorporate membranes into progeny particles (5). The growing interest in understanding how virus factories form, coupled with technical advances in genomics, proteomics, and cell imaging, has advanced our knowledge of the biogenesis and architecture of these unique structures. However, for many viruses, it is not known how these structures form and mediate their functions.

Mammalian orthoreoviruses (reoviruses) are nonenveloped,

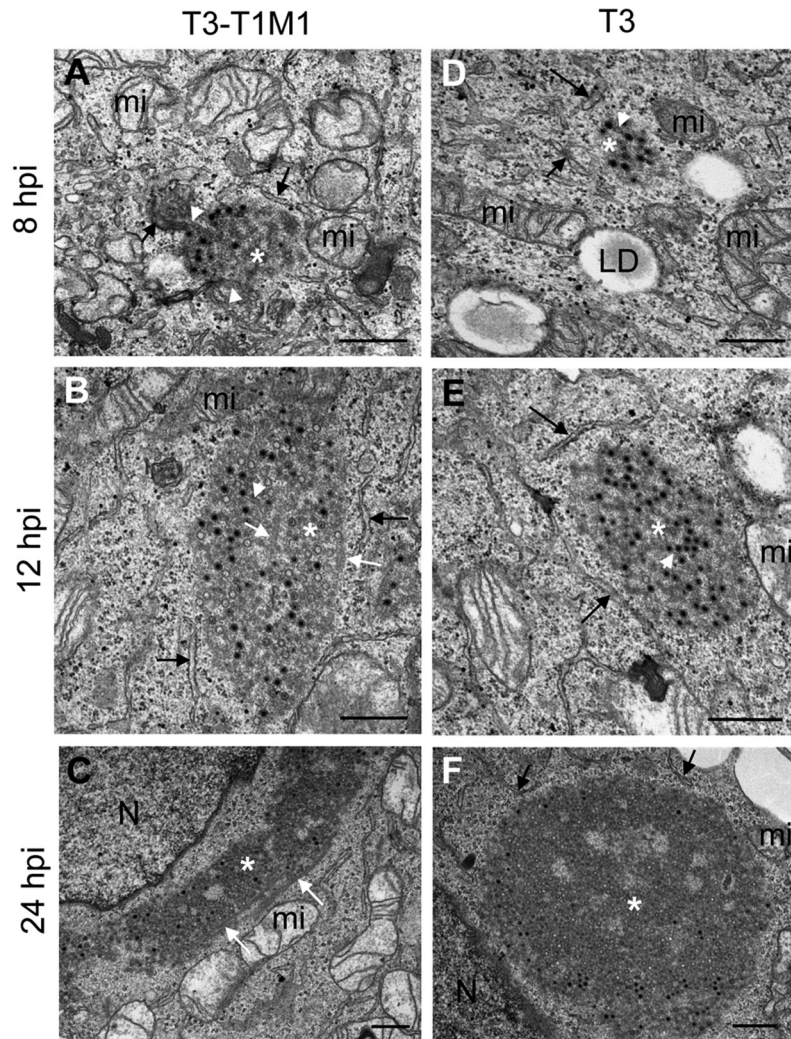


FIG 1 Ultrastructure of reovirus inclusions in HeLa cells. HeLa cells were infected with reovirus strain T3-T1M1 (A to C) or T3 (D to F) and fixed at 8, 12, or 24 hpi. Ultrathin (~60- to 70-nm) sections were imaged by TEM. Inclusions are marked with white asterisks, RER cisternae are marked with black arrows, smooth membranes inside inclusions are marked with white arrowheads, and coated microtubules are marked with white arrows. T3-T1M1 inclusions at 8 (A), 12 (B), and 24 (C) hpi and T3 inclusion at 8 (D), 12 (E), and 24 (F) hpi are shown. LD, lipid droplet; mi, mitochondria; N, nucleus. Scale bars: 0.5 μ m.

double-shelled viruses that contain a genome of 10 double-stranded RNA (dsRNA) segments (6). Following the entry of reovirus into cells, the outer capsid is removed within the endocytic compartment (7–9), which allows the release of transcriptionally active core particles into the cytoplasm (10–13). These particles initiate a primary round of transcription to produce full-length, message-sense, single-stranded RNAs (ssRNAs) corresponding to each viral gene segment (14, 15). Reovirus ssRNAs can be translated and also serve as templates for minus-strand synthesis to generate nascent genomic dsRNA within replicase particles (16). These particles initiate a secondary round of transcription that fuels most viral protein synthesis (17). Particle assembly is completed by the addition of outer-capsid proteins onto nascent cores.

Viral RNA assortment, genome replication, secondary transcription, and particle assembly occur within specialized virus-derived neo-organelles, termed inclusions, which form in the host cell cytoplasm (14, 16, 18–22). Inclusions can be detected by confocal microscopy as early as 4 h postinfection (hpi) and contain

viral proteins and dsRNA, as well as particles at various stages of morphogenesis (23–26). Mature viral progeny are arranged in paracrystalline arrays at late times postinfection prior to viral release (18, 21, 27). It is not thought that reovirus inclusions require membrane for their formation or function.

Most cell lines are readily infected by numerous reovirus strains (6). However, Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells are susceptible to infection by reovirus strain type 1 Lang (T1) but not strain type 3 Dearing (T3) (28, 29). The primary determinant of this replication difference is the viral *M1* gene (29), which encodes $\mu 2$, a multifunctional replication protein. The critical $\mu 2$ -dependent function in the replication cycle in MDCK cells occurs at a postentry step in the viral life cycle, following primary transcription and translation but prior to dsRNA synthesis (29). Further characterization of T3 replication in MDCK cells revealed that particle assembly is defective (30). These studies indicate that events within the inclusion involving the interaction of viral proteins and cell-type-specific factors promote the development of

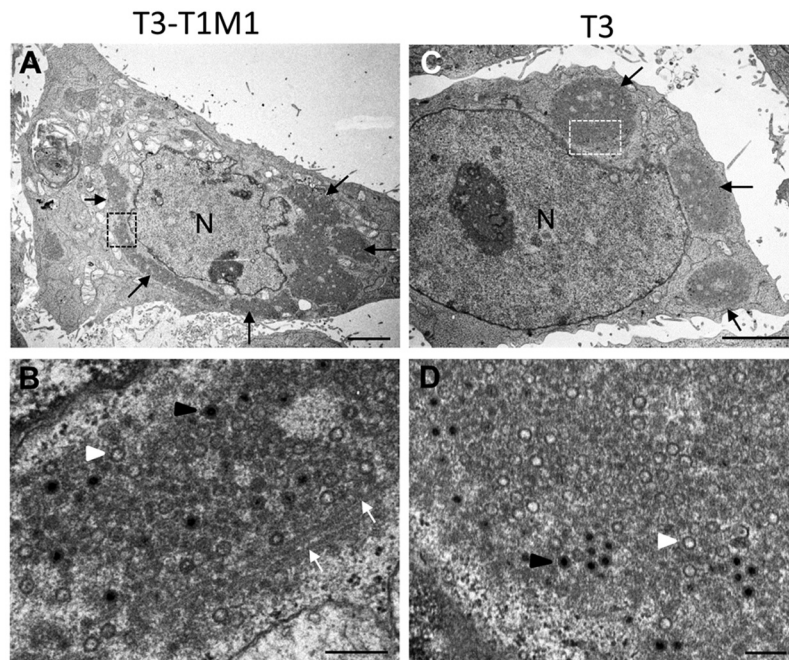


FIG 2 TEM of HeLa cells infected with reovirus strain T3-T1M1 or T3 at 24 hpi. Low (A) and high (B) magnifications of cells infected with T3-T1M1 are shown. (A) Perinuclear inclusion (black arrows). (B) Enlargement of highlighted area in panel A. The inclusion contains filled viral particles (black arrowhead), empty viral particles (white arrowhead), and coated microtubules (white arrows). (C, D) Low (C) and high (D) magnifications of cells infected with T3. In panel C, perinuclear inclusions are marked with black arrows. Panel D is an enlargement of the boxed area in panel C. The inclusion contains filled (black arrowhead) and empty (white arrowhead) particles. Scale bars: 3 μ m in panels A and C, 0.25 μ m in panels B and D.

inclusions with the capacity to generate fully assembled infectious virions. Thus, the formation of reovirus inclusions is a determinant of virus cell tropism.

In this study, we used transmission electron microscopy (TEM), three-dimensional (3D) image reconstructions, and immunofluorescence confocal microscopy to study the composition and organization of reovirus neo-organelles. Surprisingly, we found that reovirus inclusions formed in HeLa cells are membranous webs in which viral particles are embedded. Using organelle markers, we found that the endoplasmic reticulum (ER) and ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC) are remodeled during infection and codistribute with inclusions. Membrane recruitment also occurs during reovirus infection of MDCK cells, suggesting a function for cellular membranes in reovirus replication in different cell types. These results suggest that reovirus inclusions are complex structures that recruit cell membranes to house functions required for viral replication.

RESULTS

Reovirus inclusions are surrounded by membranes and mitochondria. To define the organization of reovirus inclusions, we performed ultrastructural studies of infected cells. HeLa cells were infected with reovirus strain T3-T1M1 or T3, each of which establishes productive infection of this cell line (data not shown), and imaged by TEM. We observed that inclusions formed by either strain were partially surrounded by ER membranes (Fig. 1). Mitochondria and rough ER (RER) cisternae surrounded and attached to inclusions at 8 and 12 hpi (Fig. 1A and B and D and E). Quantification of imaging data from 53 randomly selected inclusions showed that RER elements associated with all of them.

Smooth membranes were frequently observed to be connected with the interior of inclusions (white arrowheads in Fig. 1A). Thick, coated microtubules were detected inside and adjacent to the inclusions formed by both strains at 12 and 24 hpi but were not observed at 8 hpi (Fig. 1B and C and 2). At 24 hpi, inclusions developed into large structures that occupied extensive areas of the cytosol (Fig. 1C and F and 2A and C) with mitochondria and RER cisternae remaining closely apposed. No significant changes in mitochondrial morphology or integrity were observed during infection. Most of the viral particles within inclusions at early times (8 and 12 hpi) exhibited mature morphology, as demonstrated by dark staining inside the viral particle surrounded by lighter staining (Fig. 1A and B and D and E). However, at 24 hpi, empty particles were more numerous (Fig. 2B and D).

Imaging of cells at higher magnification showed details of the membranes and microtubules contained within reovirus inclusions (Fig. 3). RER elements were observed attached at discrete points to the inclusion periphery, but characteristic RER cisternae were rarely observed inside these structures. However, the smooth membranes associated with cytosolic viral particles and seen inside inclusions appeared to be connected to RER (Fig. 3A and B). Occasionally, RER elements on the periphery of inclusions were joined with cubic membrane sheets (Fig. 3C) reminiscent of the membranous platforms assembled by other viruses (5, 31). Coated microtubules were found to fill the inclusions at 24 hpi (Fig. 3D). Both filled and empty viral particles appeared to attach to coated microtubules but not to uncoated microtubules (Fig. 3E).

Cell membranes are associated with inclusions during non-productive T3 infection in MDCK cells. In contrast to HeLa cells,

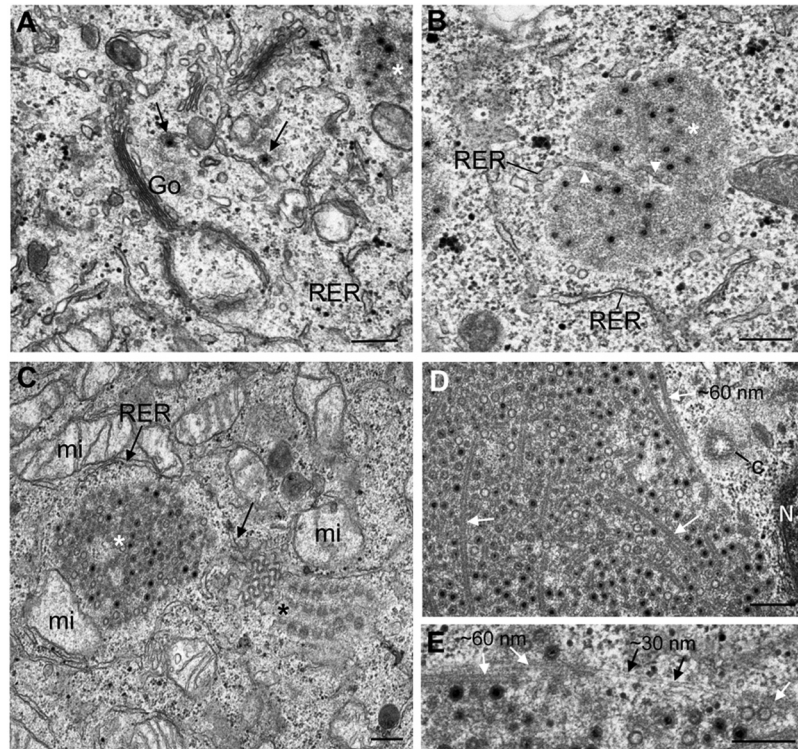


FIG 3 TEM of viral inclusions in T3-T1M1-infected HeLa cells. Inclusions are marked with white asterisks. (A) Viral particles (arrows) in small inclusions attached to membranes in a region containing RER and the Golgi compartment at 8 hpi. (B) Smooth membranes (white arrowheads) inside an inclusion surrounded by RER at 8 hpi. (C) Inclusion at 12 hpi surrounded by mitochondria and ER membranes. Some RER elements close to the inclusion (arrow on the right) appear to be connected to a sheet of cubic membranes (black asterisk). (D) Inclusion at 24 hpi filled with coated microtubules (white arrows). (E) Higher magnification of a different inclusion with viral particles attached to coated (~60 nm, white arrows) but not uncoated (~30 nm, black arrows) microtubules. N, nucleus; C, centriole. Scale bars: 0.25 μ m.

reovirus strains T3 and T3-T1M1 differ in the capacity to complete a replication cycle in MDCK cells (28, 29). Although T3 can infect MDCK cells and form inclusion-like structures, yields of viral progeny in these cells are markedly less than those produced by T3-T1M1 (29, 30). To determine whether membranes are associated with the inclusions formed by reovirus in another cell type and to gain insight into the elements required for the biogenesis of functional inclusions, we imaged MDCK cells infected with either T3-T1M1 (permissive) or T3 (nonpermissive) reovirus (see Fig. S1 in the supplemental material). Inclusions formed in MDCK cells infected with T3-T1M1 at 8, 12, and 24 hpi were similar to those observed in HeLa cells. In contrast, inclusion formation was delayed in T3-infected MDCK cells, consistent with previous observations (29; data not shown). Accordingly, inclusions in T3-infected MDCK cells were scarce at 8 and 12 hpi but numerous and large at 24 hpi (data not shown). ER membranes and mitochondria were associated with inclusions formed in cells infected with either virus strain (see Fig. S1A, D, and E). Vacuoles containing fibers and a few viral particles were observed in inclusions assembled by T3 reovirus (see Fig. S1E). However, microtubules were observed only in the inclusions assembled by T3-T1M1 (see Fig. S1A and B). Inclusions formed in T3-T1M1-infected cells contained numerous mature virions and few empty particles (see Fig. S1C), whereas in cells infected by T3, the inclusions contained numerous empty particles and few mature virions (see Fig. S1F). These data corroborate previous TEM studies of reovirus infec-

tion of MDCK cells (29, 30). In addition, T3 inclusions were filled with many smaller particles, which appeared to be subassemblies of macromolecules containing nucleic acid, as shown by a density darker than that in empty particles. These particles were irregular in size and did not have a shell (see Fig. S1F). These findings suggest that reovirus recruits membranes to the inclusions formed in HeLa and MDCK cells.

Reovirus inclusions associate with ERGIC and ER elements.

To elucidate the cellular source of the inclusion-associated membranes, we stained T3-T1M1-infected HeLa and MDCK cells with different organelle markers (Fig. 4; see Fig. S2 in the supplemental material). Viral inclusions were marked with an antibody specific for the σ NS protein, which is an essential reovirus inclusion component (23, 25, 32). ER marker protein disulfide isomerase (PDI) distributed with inclusions in both HeLa cells (see Fig. S2A to C) and MDCK cells (data not shown). Golgi compartment markers giantin and wheat germ agglutinin (WGA) were not associated with inclusions during infection, and the staining patterns of each did not differ between infected and uninfected cells (see Fig. S2D to I). These findings make it unlikely that the Golgi compartment serves as a source of membranes associated with reovirus inclusions. Higher-magnification images showed ER marker PDI in close apposition to viral inclusions at early and late times after infection (Fig. 4A to F), whereas the PDI staining was mostly perinuclear in uninfected cells (see Fig. S2A to C). Type I transmembrane protein ERGIC-53, which has been used in previous studies

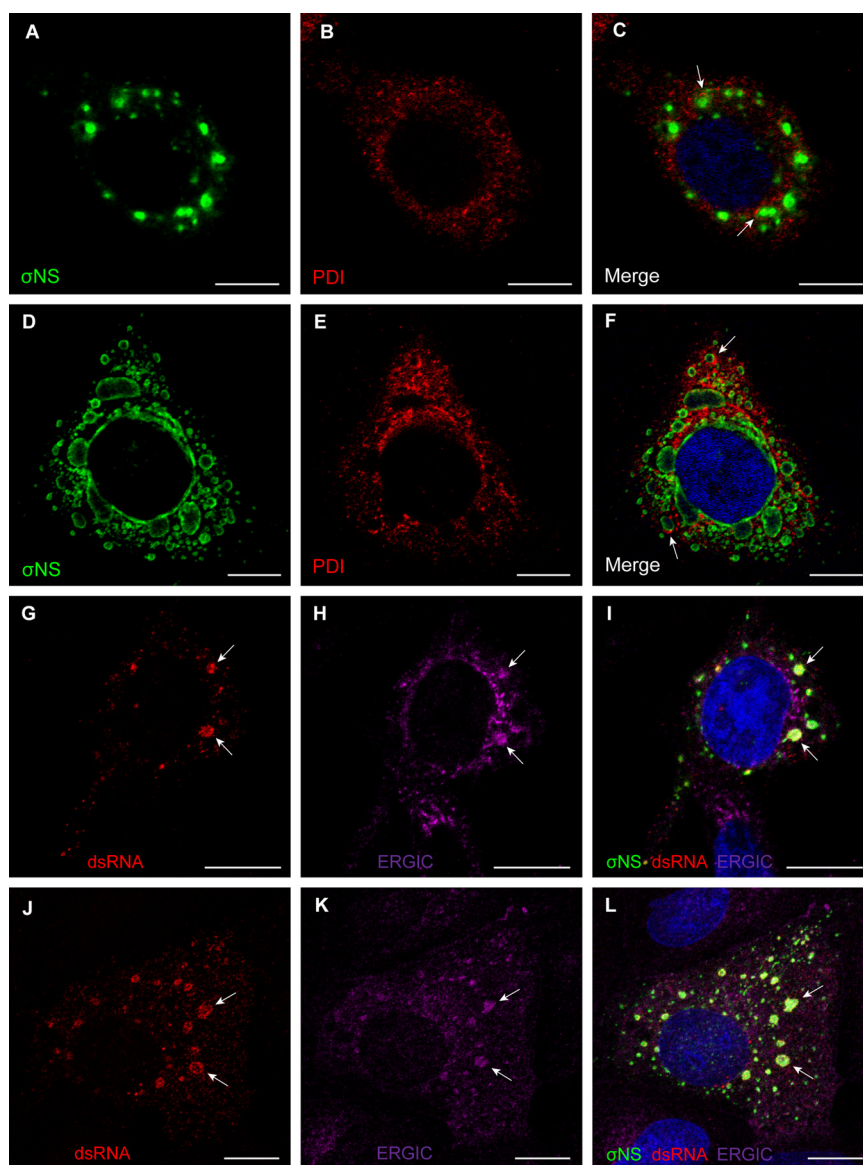


FIG 4 Reovirus inclusions codistribute with ER and ERGIC elements. (A to F) HeLa cells were infected with T3-T1M1 for 12 h (A to C) or 24 h (D to F). Cells were fixed; permeabilized; stained for σ NS (green), PDI (red), or nuclei (blue); and visualized by confocal microscopy. Arrows indicate viral inclusions associated with RER elements on the periphery. (G to L) HeLa cells (G to I) and MDCK cells (J to L) were infected with T3-T1M1 for 12 h; fixed; permeabilized; stained for dsRNA (red), ERGIC-53 (magenta), σ NS (green), or nuclei (blue); and visualized by confocal microscopy. Arrows indicate viral inclusions that contain dsRNA, the ERGIC, and σ NS. Scale bars: 10 μ m.

to mark the ERGIC (33), localized within inclusion structures in both HeLa and MDCK cells (Fig. 4G to L), as does the KDEL receptor (see Fig. S2J to L), which marks the ERGIC and Golgi compartment. Collectively, these observations suggest that the ERGIC, a membranous system that functionally links the ER and the Golgi compartment, is a source of inclusion-associated membranes, consistent with our TEM studies.

To confirm that inclusions localizing with ERGIC-53 support viral replication, T3-T1M1-infected HeLa and MDCK cells were stained with a dsRNA-specific antibody (Fig. 4G to L). Staining for dsRNA codistributed with inclusion marker σ NS and ERGIC-53 inside the inclusions. These data suggest that membrane-filled inclusions are sites of reovirus RNA replication.

Serial sections and 3D reconstructions reveal that reovirus inclusions are membranous webs that contain microtubules. To understand the global architecture of inclusions and the contribution of cell membranes and specific organelles to the construction of these structures, we generated 3D reconstructions of reovirus inclusions. Oriented serial sections of reovirus-infected cells were imaged by TEM and processed for 3D reconstruction (see Fig. S3 and 4 in the supplemental material). The resulting 3D reconstructions showed that inclusions in HeLa cells are membranous webs surrounded by mitochondria (Fig. 5; see Fig. S3A and B and Fig. S5 in the supplemental material). Smooth membranes of the inclusions were observed to contact mitochondria in a variety of orientations (arrows in Fig. 5; see Movie S1 in the supplemental mate-

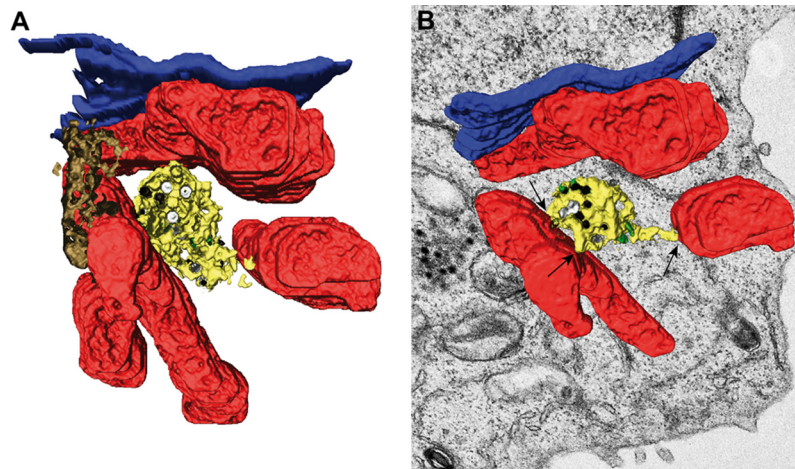


FIG 5 3D model of reovirus inclusions in HeLa cells. HeLa cells were infected with T3-T1M1 and fixed at 12 hpi. The inclusion was visualized by TEM of serial sections, 3D reconstruction, and image processing. (A) Mitochondria (red) surround a network of membranes (yellow). RER (brown) and nuclear envelope (blue) are adjacent to the inclusion. Filled viral particles (black), empty viral particles (white), and microtubules (green) are integrated into the inclusion membrane network. (B) Rotation of the same reconstruction showing contacts between the inclusion membranes and mitochondria (arrows). The volume has been superimposed onto the 2D image of one of the sections in the series.

rial). RER cisternae also were observed to contact the inclusion membranes and adjacent mitochondria (see Fig. S5 and Movie S2). Microtubules and viral particles were embedded in the inclusion membranous webs (Fig. 5; see Fig. S5A, and B). As detected by 3D TEM, viral particles appeared to be attached to microtubules (see Fig. S5C and D). These features were observed in all of the 3D reconstructions prepared from serial sections of reovirus-infected cells (data not shown).

To analyze the morphology of inclusions formed by reovirus strains that vary in the capacity to complete an infectious cycle, TEM images were processed to generate 3D reconstructions of inclusions formed in MDCK cells infected with strain T3-T1M1 or T3 (Fig. 6). Numerous mitochondria and RER cisternae were observed to surround the inclusions formed in T3-T1M1-infected cells (Fig. 6A). RER membranes appeared to contact the smooth membranes of the inclusions at 24 hpi, which are filled with mature virions, empty particles, and microtubules (Fig. 6A; see Movie S3 in the supplemental material). However, inclusions formed in T3-infected cells do not contain microtubules. In addition, most of the viral particles inside the membranous web in T3-infected cells were empty, and fewer filled particles were observed (Fig. 6B; see Movie S4). RER and mitochondria surrounded the inclusions formed by T3 reovirus. Inclusions assembled during T3-T1M1 infection were frequently observed close to the plasma membrane at 24 hpi. Image reconstructions of those inclusions showed viral particles adjacent to the plasma membrane and attached to smooth membranes, RER cisternae, and microtubules (Fig. 6C to E; see Movie S5). Together, our data indicate that reovirus inclusions are associated with ER and ERGIC membranes and mitochondria, highlighting these cellular organelles as important constituents of viral replication factories.

DISCUSSION

In this study, we demonstrated that inclusions formed by reovirus are associated with cell membranes. The participation of cell membranes within inclusions is a new finding for reoviruses,

which previously had been thought to form inclusion complexes devoid of membranes. However, other *Reoviridae* viruses require membranes to replicate. *Hyposoter exiguae* reovirus (a reovirus of the parasitoid wasp *H. exiguae*) is released from infected cells exclusively by budding (34). Orbiviruses are variously described as being membranophilic (35), pseudoenveloped (36), or transiently enveloped (37). Rotavirus morphogenesis requires penetration of the ER to acquire outer-shell proteins VP4 and VP7 (38, 39). Therefore, the use of cell membranes to promote replication, assembly, or release may be a general feature of dsRNA viruses.

Previous studies of the ultrastructure of reovirus inclusions clearly demonstrate the presence of microtubules, but membranes in association with inclusions have not been described (18, 30). The discordance between our results and those obtained previously might be attributable to differences in the time postinfection chosen for analysis and the strategies used for TEM. In conventional TEM, samples must be thin, <100 nm, for electrons to be able to traverse them and generate a projection image. These ultrathin sections of eukaryotic cells are single planes of much larger volumes. Moreover, when analysis is restricted to random sections of cells, scarce or nonrandomly distributed elements can be missed. Oriented serial sections and 3D reconstructions avoid these limitations and allow imaging of whole cells and a comprehensive analysis of intracellular contacts (5, 40, 41). This analysis was instrumental in our finding that reovirus inclusions are embedded in membrane.

Our 3D image reconstructions have revealed the complex organization of reovirus inclusions and the participation of cell membranes (most likely derived from the ERGIC), mitochondria, and microtubules in inclusion structure. Confocal microscopy studies confirmed an association of the inclusions with the ER and ERGIC and suggest that the Golgi complex does not contribute to inclusion formation. Viral particles appear to attach to coated microtubules and membranes inside the inclusion and remain attached when reaching the plasma membrane. Microtubule coats are likely to contain the viral $\mu 2$ protein, which associates with

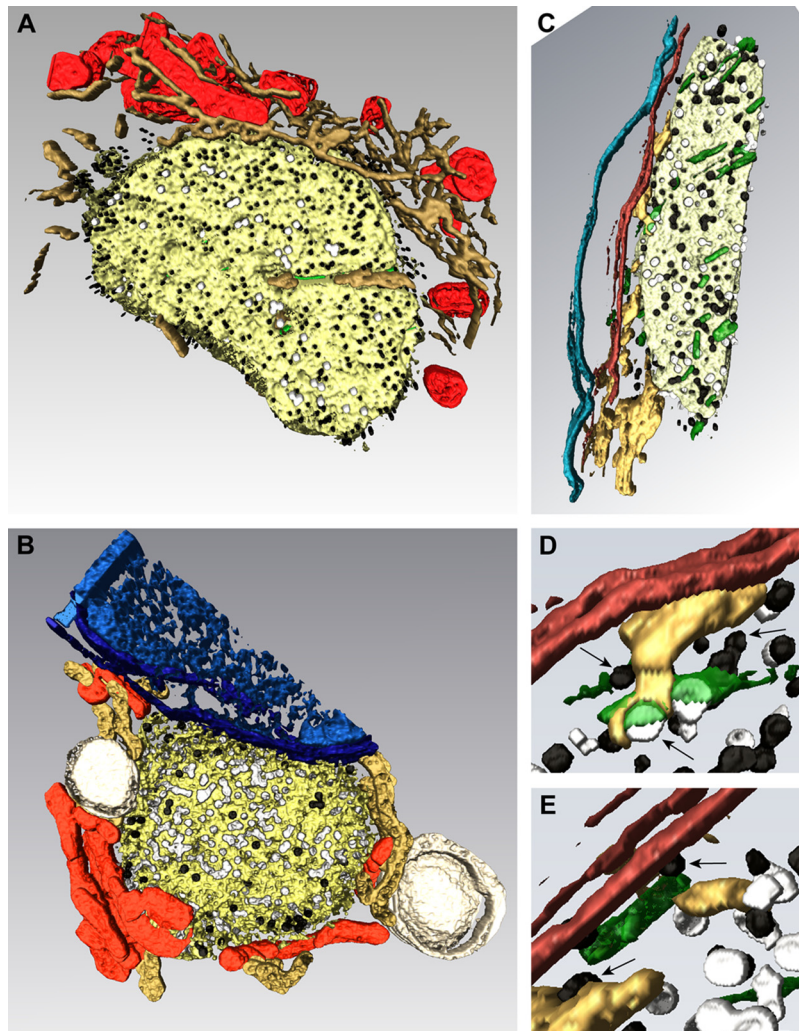


FIG 6 3D model of reovirus inclusions in MDCK cells. MDCK cells were infected with T3-T1M1 (A and C to E) or T3 (B) and fixed at 24 hpi. Membranes (yellow), mitochondria (red), RER (light brown), microtubules (green), filled viral particles (black), and empty viral particles (white) are shown. (A) Image reconstruction of an inclusion formed in T3-T1M1-infected cells. RER membranes surround and incorporate into the inclusion membrane network that contains numerous mature virions, fewer empty particles, and microtubules. (B) Image reconstruction of an inclusion formed in T3-infected cells. Most of the viral particles inside the membranous web are empty. No microtubules were observed inside or around the inclusion. Mitochondria, RER, and lipid droplets (large white structures) surround the inclusion, which is in contact with the nuclear envelope (blue). (C) Image reconstruction of an inclusion close to the plasma membrane (brown) in a cell infected with T3-T1M1. The plasma membrane from another cell is colored blue. The inclusion contains membranes (yellow) and filled (black) and empty (white) viral particles. Peripheral RER elements, microtubules, and viral particles are in contact with the cytosolic face of the plasma membrane. Enlargements of this region are shown in panels D and E. Viral particles attached to RER, microtubules, and the plasma membrane (arrows) are visible.

microtubules (42), as well as other viral and perhaps cellular proteins. When a complete analysis is performed with serial sections and 3D reconstructions, all of the inclusions identified in both HeLa and MDCK cells are associated with mitochondria, ER elements, and membranous webs. We think that the cell membranes within inclusions serve as a physical scaffold for inclusion formation and organize the reovirus nonstructural and structural proteins required for viral genome replication and progeny particle assembly. In this regard, RER cisternae make numerous contacts with reovirus inclusions but do not surround them completely. The association of RER with reovirus inclusions is reminiscent of the structures of rubella virus replication organelles (43). In rubella virus factories, RER cisternae provide a framework for newly

synthesized viral proteins to incorporate into viral replication complexes (43).

Mitochondria are recruited to factories assembled by many viruses (5). In keeping with this general feature of viral replication, our 3D image reconstructions showed numerous contacts between reovirus inclusion membranes and mitochondria. Moreover, new interorganelle contacts have been visualized within reovirus factories. For example, attachment of mitochondria to ERGIC, the Golgi compartment, or lysosomes is not observed in uninfected mammalian cells (5). Mitochondria may be used as an energy source to power viral replication and also supply host factors required for viral genome synthesis and particle assembly, as reported for rubella virus and tombusviruses (5, 43). In reovirus-

infected cells, the transfer of energy and host factors likewise might be mediated by the physical contacts between mitochondria and the inclusion membranous webs. RER also might serve as the source of viral and cellular proteins required for inclusion activities.

The inclusions assembled in MDCK cells infected with strain T3, which enters these cells but does not complete an infectious cycle (28, 29), contain membrane but lack microtubules. This finding suggests that microtubules are required for the functional organization of inclusions and assembly of progeny particles. Moreover, this finding provides a potential explanation for the genetic linkage between the replication differences displayed by reovirus strains in MDCK cells and the $\mu 2$ -encoding *M1* gene (28, 29). The $\mu 2$ protein interacts with microtubules and dictates inclusion morphology (42). Concordantly, microtubules are observed in inclusions assembled by both T3 and T3-T1M1 in HeLa cells, which support the replication of both strains (data not shown). Microtubule function might be required to transport essential components to inclusions, organize inclusion content, or compartmentalize inclusion activities. Microtubules also might be required to transport progeny particles to the plasma membrane for subsequent release. It is not known whether microtubules incorporate into small inclusions and enhance inclusion coalescence and growth, as reported for some other viruses (44, 45). The delay in inclusion formation during T3 infection of MDCK cells also could point to a defect in the recruitment or remodeling of cell membranes. We observed membranes in association with inclusions from the initial stages of inclusion assembly in HeLa cells infected with either T3 or T3-T1M1, suggesting that membranes could potentiate steps required for inclusion biogenesis.

An important question left unanswered by our study is the mechanism by which progeny viral particles migrate from inclusions to the cell periphery and exit infected cells. Reovirus exits some cells by lysis (28, 46, 47). However, egress of virus from polarized endothelial cells (48) and epithelial cells (49) is noncytolytic. The mechanism by which nonenveloped viral particles are released from infected cells without inducing cell lysis is not known. ER membranes could be used by reovirus to traffic to the cell periphery through some type of vesicular transport pathway that bypasses the Golgi apparatus, as suggested by our 3D reconstructions (Fig. 6). Unconventional vesicular trafficking has been suggested for rotavirus egress, which also bypasses the Golgi apparatus to reach the cell periphery (50). The rotavirus spike protein VP4 is particularly important for this process. Despite not having transmembrane domains, VP4 interacts with lipids and is enriched in lipid rafts (51). VP4 is essential for rotavirus release, as it interacts with actin filaments in infected cells (52). A homologous reovirus protein responsible for interaction with lipids is not known. All reovirus proteins lack transmembrane domains, and posttranslational modifications are not completely defined, although the $\mu 1$ protein contains a myristoyl moiety (53). Lipidation of reovirus proteins, specifically at late times after infection, might be required for membrane recruitment and particle transport to the cell periphery.

New technologies now offer access to the analysis of viruses in cells in unprecedented detail. The complexity of the interaction networks established in these contexts is changing our concept of viruses from that of inert chemicals to living entities capable of performing a wide variety of intracellular functions. Reovirus inclusions appear to assemble as membranous replication organ-

elles that are usually associated with mitochondria. However, it is not known how the cellular organelles are recruited, how macromolecular transport operates inside the inclusions to connect viral replication and morphogenesis, and how nonenveloped viruses like reovirus exit the membranous scaffolds and leave the cell. With the information provided by this study, we now can initiate functional and mechanistic studies to identify the signals that regulate the biogenesis and activities of viral inclusions. This work will enhance our knowledge of the cell biology of virus replication and provide potential new therapeutic targets to ameliorate diseases caused by pathogenic viruses.

MATERIALS AND METHODS

Cells and viruses. Spinner-adapted murine L929 fibroblast cells were grown in either suspension or monolayer cultures as previously described (54). HeLa CCL2 cells and MDCK cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 4.5 g/liter glucose, L-glutamine, and sodium pyruvate (Mediatech) supplemented to contain 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin G (Gibco), 100 μ g/ml streptomycin (Gibco), and 0.25 μ g/ml amphotericin B (Sigma). Reovirus strains T3 and T3-T1M1 were recovered by using plasmid copies of gene segment cDNAs as previously described (29). Virus was purified by cesium gradient centrifugation as previously described (55). Viral titers were determined by plaque assay with L929 cells (56).

TEM. Virus was allowed to adsorb to monolayers of HeLa and MDCK cells at a multiplicity of infection (MOI) of 20 PFU/cell. Following incubation at 37°C for 8, 12, or 24 h, cells were fixed at room temperature for 1 h with a mixture of 4% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde in phosphate-buffered saline (pH 7.4), postfixed with 1% osmium tetroxide, dehydrated in increasing concentrations of acetone, and processed for embedding in epoxy resin EML-812 (TAAB Laboratories) as previously described (57, 58). Osmium tetroxide is a lipid-staining agent used in TEM to provide image contrast. Osmium(VIII) oxide binds phospholipid head groups, thus providing contrast and allowing ultrastructural identification of membranes, which are apparent as dark, flexible lines with a thickness of ~5 nm (59, 60). Ultrathin (~60- to 70-nm) sections were collected on uncoated 300-mesh copper grids (TAAB Laboratories), stained with uranyl acetate and lead citrate, and imaged by TEM. Images were acquired with a JEOL JEM 1011 electron microscope operating at 100 kV.

Confocal microscopy. Virus at an MOI of 20 PFU/cell was allowed to adsorb to HeLa CCL2 cells cultivated on untreated glass coverslips and MDCK cells cultivated on poly-L-lysine (Sigma)-treated glass coverslips in 24-well plates. Following incubation at 37°C for 12 or 24 h, cells were fixed with ice-cold methanol (-20°C), permeabilized with 1% Triton X-100, and stained with σ NS-specific antibody (25) and ERGIC-53-specific antibody H-245 (Santa Cruz Biotechnology) or KDEL receptor-specific antibody FL-212 (Santa Cruz Biotechnology) for ERGIC staining, anti-giantin antibody ab24586 (Abcam) or WGA conjugated with Alexa Fluor 555 (Invitrogen) to mark the Golgi compartment, PDI-specific antibody DL-11 (Sigma) to mark the ER, or K2 antibody (40) to mark dsRNA. ToPro3 or 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Invitrogen) was used to stain nuclei. Alexa Fluor-conjugated antibodies (Invitrogen) were used as secondary antibodies. Images were acquired with Zeiss LSM 510 Meta and 710 Meta inverted confocal microscopes.

3D image reconstructions. Consecutive ultrathin (~60- to 70-nm) sections were collected on Formvar-coated copper slot grids (TAAB Laboratories), stained, and imaged by TEM. A total of eight series of 15 were selected and processed for 3D reconstruction as previously described (40, 61) (see Fig. S4 in the supplemental material). Photographs of reovirus inclusions were taken at a nominal magnification of $\times 10,000$ or $\times 12,000$. Plates were digitized as 8-bit images with a 3.39-nm final pixel size and a 600-dpi resolution with an Epson Perfection Photo 3170 scanner. Digital images were aligned by selected tracers between two consecutive sections with the free editor for serial section microscopy Reconstruct (62) (<http://>

<http://synapses.clm.utexas.edu/tools/index.stm>). Segmentation and 3D visualization were performed with Amira (<http://amira.zib.de>). Movies were prepared from the 3D reconstructions with the Camera Rotate and Movie Maker applications of the Amira software suite.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <http://mbio.asm.org/lookup/suppl/doi:10.1128/mBio.00931-13/-/DCSupplemental>.

Movie S1, AVI file, 9.3 MB.
Movie S2, AVI file, 11.6 MB.
Movie S3, AVI file, 14.2 MB.
Movie S4, AVI file, 11.9 MB.
Movie S5, AVI file, 8.8 MB.
Figure S1, TIF file, 14.8 MB.
Figure S2, TIF file, 3.1 MB.
Figure S3, TIF file, 4.8 MB.
Figure S4, TIF file, 3 MB.
Figure S5, TIF file, 5.1 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank members of the Risco and Dermody laboratories for many useful discussions and Jim Chappell and Jennifer Konopka for critical review of the manuscript. Confocal microscopy experiments were conducted in the Vanderbilt Cell Imaging Shared Resource.

This research was supported by an FPI Program fellowship (I.F.C.) and research grants BIO2009-07255 and BIO2012-33314 from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (CR), Public Health Service awards T32 GM007347 (C.M.L.), F31 NS074596 (C.M.L.), T32 HL007751 (B.A.M.), F32 AI080108 (B.A.M.), and R01 AI032539 (T.S.D.); the Vanderbilt International Scholar Program (P.F.Z.); and the Elizabeth B. Lamb Center for Pediatric Research. Additional support was provided by Public Health Service awards P30 CA68485 for the Vanderbilt-Ingram Cancer Center and P60 DK20593 for the Vanderbilt Diabetes Research and Training Center.

REFERENCES

- Miller S, Krijnse-Locker J. 2008. Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:363–374. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1890>.
- Paul D, Bartenschlager R. 2013. Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories. *World J. Virol.* 2:32–48. <http://dx.doi.org/10.5501/wjv.v2.i2.32>.
- Paul D, Hoppe S, Saher G, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R. 2013. Morphological and biochemical characterization of the membranous hepatitis C virus replication compartment. *J. Virol.* 87:10612–10627. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01370-13>.
- Novoa RR, Calderita G, Arranz R, Fontana J, Granzow H, Risco C. 2005. Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol. Cell* 97:147–172. <http://dx.doi.org/10.1042/BC20040058>.
- de Castro IF, Volonté L, Risco C. 2013. Virus factories: biogenesis and structural design. *Cell. Microbiol.* 15:24–34. <http://dx.doi.org/10.1111/cmi.12029>.
- Dermody TS, Parker JS, Sherry B. 2013. Orthoreoviruses, p 1304–1346. *In* Knipe DM, Howley PM (ed), *Fields virology*, 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Sturzenbecker LJ, Nibert M, Furlong D, Fields BN. 1987. Intracellular digestion of reovirus particles requires a low pH and is an essential step in the viral infectious cycle. *J. Virol.* 61:2351–2361.
- Baer GS, Ebert DH, Chung CJ, Erickson AH, Dermody TS. 1999. Mutant cells selected during persistent reovirus infection do not express mature cathepsin L and do not support reovirus disassembly. *J. Virol.* 73:9532–9543.
- Ebert DH, Deussing J, Peters C, Dermody TS. 2002. Cathepsin L and cathepsin B mediate reovirus disassembly in murine fibroblast cells. *J. Biol. Chem.* 277:24609–24617. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M201107200>.
- Borsa J, Morash BD, Sargent MD, Copps TP, Lievaart PA, Szekely JG. 1979. Two modes of entry of reovirus particles into L cells. *J. Gen. Virol.* 45:161–170. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-45-1-161>.
- Odegard AL, Chandran K, Zhang X, Parker JS, Baker TS, Nibert ML. 2004. Putative autocleavage of outer capsid protein $\mu 1$, allowing release of myristoylated peptide $\mu 1N$ during particle uncoating, is critical for cell entry by reovirus. *J. Virol.* 78:8732–8745. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.78.16.8732-8745.2004>.
- Agosto MA, Ivanovic T, Nibert ML. 2006. Mammalian reovirus, a non-fusogenic nonenveloped virus, forms size-selective pores in a model membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:16496–16501. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0605835103>.
- Ivanovic T, Agosto MA, Zhang L, Chandran K, Harrison SC, Nibert ML. 2008. Peptides released from reovirus outer capsid form membrane pores that recruit virus particles. *EMBO J.* 27:1289–1298. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2008.60>.
- Watanabe Y, Millward S, Graham AF. 1968. Regulation of transcription of the reovirus genome. *J. Mol. Biol.* 36:107–123. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836\(68\)90223-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(68)90223-4).
- Shatkin AJ, LaFiandra AJ. 1972. Transcription by infectious subviral particles of reovirus. *J. Virol.* 10:698–706.
- Antczak JB, Joklik WK. 1992. Reovirus genome segment assortment into progeny genomes studied by the use of monoclonal antibodies directed against reovirus proteins. *Virology* 187:760–776. [http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90478-8](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(92)90478-8).
- Skup D, Millward S. 1980. Reovirus-induced modification of cap dependent translation in infected L cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77:152–156. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.77.1.152>.
- Dales S, Omato PJ. 1965. The uptake and development of reovirus in strain L cells followed with labelled viral ribonucleic acid and ferritin-antibody conjugates. *Virology* 25:193–211. [http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(65\)90199-6](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(65)90199-6).
- Morgan EM, Zweerink HJ. 1974. Reovirus morphogenesis: core-like particles in cells infected at 39 degrees with wild-type reovirus and temperature-sensitive mutants of groups B and G. *Virology* 59:556–565. [http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(74\)90465-6](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(74)90465-6).
- Morgan EM, Zweerink HJ. 1975. Characterization of transcriptase and replicase particles isolated from reovirus infected cells. *Virology* 68:455–466. [http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(75\)90286-X](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(75)90286-X).
- Rhim JS, Jordan LE, Mayor HD. 1962. Cytochemical, fluorescent-antibody and electron microscopic studies on the growth of reovirus (echo 10) in tissue culture. *Virology* 17:342–355. [http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(62\)90125-3](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(62)90125-3).
- Zweerink HJ, Morgan EM, Skyler JS. 1976. Reovirus morphogenesis: characterization of subviral particles in infected cells. *Virology* 73:442–453. [http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(76\)90405-0](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(76)90405-0).
- Becker MM, Goral MI, Hazelton PR, Baer GS, Rodgers SE, Brown EG, Coombs KM, Dermody TS. 2001. Reovirus σ NS protein is required for nucleation of viral assembly complexes and formation of viral inclusions. *J. Virol.* 75:1459–1475. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.75.3.1459-1475.2001>.
- Broering TJ, Parker JS, Joyce PL, Kim J, Nibert ML. 2002. Mammalian reovirus nonstructural protein μ NS forms large inclusions and colocalizes with reovirus microtubule-associated protein $\mu 2$ in transfected cells. *J. Virol.* 76:8285–8297. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.76.16.8285-8297.2002>.
- Becker MM, Peters TR, Dermody TS. 2003. Reovirus σ NS and μ NS proteins form cytoplasmic inclusion structures in the absence of viral infection. *J. Virol.* 77:5948–5963. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.77.10.5948-5963.2003>.
- Broering TJ, Kim J, Miller CL, Piggott CD, Dinoso JB, Nibert ML, Parker JS. 2004. Reovirus nonstructural protein μ NS recruits viral core surface proteins and entering core particles to factory-like inclusions. *J. Virol.* 78:1882–1892. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.78.4.1882-1892.2004>.
- Dales S. 1963. Association between the spindle apparatus and reovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 50:268–275. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.50.2.268>.
- Rodgers SE, Barton ES, Oberhaus SM, Pike B, Gibson CA, Tyler KL, Dermody TS. 1997. Reovirus-induced apoptosis of MDCK cells is not linked to viral yield and is blocked by Bcl-2. *J. Virol.* 71:2540–2546.
- Ooms LS, Kobayashi T, Dermody TS, Chappell JD. 2010. A post-entry step in the mammalian orthoreovirus replication cycle is a determinant of cell tropism. *J. Biol. Chem.* 285:41604–41613. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.176255>.

30. Ooms LS, Jerome WG, Dermody TS, Chappell JD. 2012. Reovirus replication protein M2 influences cell tropism by promoting particle assembly within viral inclusions. *J. Virol.* 86:10979–10987. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01172-12>.
31. Deng Y, Almshehri ZA, Ng MM, Kohlwein SD. 2010. Do viruses subvert cholesterol homeostasis to induce host cubic membranes? *Trends Cell Biol.* 20:371–379. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2010.04.001>.
32. Miller CL, Broering TJ, Parker JS, Arnold MM, Nibert ML. 2003. Reovirus sigmaNS protein localizes to inclusions through an association requiring the μ NS amino terminus. *J. Virol.* 77:4566–4576. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.77.8.4566-4576.2003>.
33. Hauri HP, Kappeler F, Andersson H, Appenzeller C. 2000. ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway. *J. Cell Sci.* 113:587–596.
34. Stoltz D, Makkay A. 2000. Co-replication of a reovirus and a polydnavirus in the ichneumonid parasitoid *Hyposoter exiguae*. *Virology* 278: 266–275. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.2000.0652>.
35. Foster N, Alders M. 1979. Bluetongue virus: a membraned structure, p 48–49. *In* Proc. Annu. Meet. Microsc. Soc. Am. Microscopy Society of America, Reston, VA.
36. Els HJ, Verwoerd DW. 1969. Morphology of bluetongue virus. *Virology* 38:213–219. [http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(69\)90362-6](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(69)90362-6).
37. Hyatt AD, Zhao Y, Roy P. 1993. Release of bluetongue virus-like particles from insect cells is mediated by BTV nonstructural protein NS3/NS3A. *Virology* 193:592–603. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.1993.1167>.
38. Estes MK, Greenberg HB. 2013. Rotaviruses, p 1347–1401. *In* Knipe DM, Howley PM (ed), *Fields virology*, 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
39. Poruchynsky MS, Maass DR, Atkinson PH. 1991. Calcium depletion blocks the maturation of rotavirus by altering the oligomerization of virus-encoded proteins in the ER. *J. Cell Biol.* 114:651–661.
40. Fontana J, López-Montero N, Elliott RM, Fernández JJ, Risco C. 2008. The unique architecture of Bunyamwera virus factories around the Golgi complex. *Cell. Microbiol.* 10:2012–2028. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01184.x>.
41. Risco C, Fernández de Castro I. 2013. Virus morphogenesis in the cell: methods and observations. *Subcell. Biochem.* 68:417–440. http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-6552-8_14.
42. Parker JS, Broering TJ, Kim J, Higgins DE, Nibert ML. 2002. Reovirus core protein M2 determines the filamentous morphology of viral inclusion bodies by interacting with and stabilizing microtubules. *J. Virol.* 76: 4483–4496. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.76.9.4483-4496.2002>.
43. Fontana J, López-Iglesias C, Tzeng WP, Frey TK, Fernández JJ, Risco C. 2010. Three-dimensional structure of rubella virus factories. *Virology* 405: 579–591. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2010.06.043>.
44. Eichwald C, Arnoldi F, Laimbacher AS, Schraner EM, Fraefel C, Wild P, Burrone OR, Ackermann M. 2012. Rotavirus viroplasm fusion and perinuclear localization are dynamic processes requiring stabilized microtubules. *PLoS One* 7:e47947. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0047947>.
45. Howard AR, Moss B. 2012. Formation of orthopoxvirus cytoplasmic A-type inclusion bodies and embedding of virions are dynamic processes requiring microtubules. *J. Virol.* 86:5905–5914. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.06997-11>.
46. Tyler KL, Squier MK, Rodgers SE, Schneider BE, Oberhaus SM, Grdina TA, Cohen JJ, Dermody TS. 1995. Differences in the capacity of reovirus strains to induce apoptosis are determined by the viral attachment protein sigma1. *J. Virol.* 69:6972–6979.
47. Connolly JL, Barton ES, Dermody TS. 2001. Reovirus binding to cell surface sialic acid potentiates virus-induced apoptosis. *J. Virol.* 75: 4029–4039. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.75.9.4029-4039.2001>.
48. Lai CM, Mainou BA, Kim KS, Dermody TS. 2013. Directional release of reovirus from the apical surface of polarized endothelial cells. *mBio* 4:e00049–e00013. <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00049-13>.
49. Excoffon KJ, Guglielmi KM, Wetzel JD, Gansemer ND, Campbell JA, Dermody TS, Zabner J. 2008. Reovirus preferentially infects the basolateral surface and is released from the apical surface of polarized human respiratory epithelial cells. *J. Infect. Dis.* 197:1189–1197. <http://dx.doi.org/10.1086/529515>.
50. Jourdan N, Maurice M, DeLautier D, Quero AM, Servin AL, Trugnan G. 1997. Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi apparatus. *J. Virol.* 71:8268–8278.
51. Cuadras MA, Bordier BB, Zambrano JL, Ludert JE, Greenberg HB. 2006. Dissecting rotavirus particle-raft interaction with small interfering RNAs: insights into rotavirus transit through the secretory pathway. *J. Virol.* 80:3935–3946. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.80.8.3935-3946.2006>.
52. Gardet A, Breton M, Trugnan G, Chwetzoff S. 2007. Role for actin in the polarized release of rotavirus. *J. Virol.* 81:4892–4894. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02698-06>.
53. Nibert ML, Schiff LA, Fields BN. 1991. Mammalian reoviruses contain a myristoylated structural protein. *J. Virol.* 65:1960–1967.
54. Boehme KW, Guglielmi KM, Dermody TS. 2009. Reovirus nonstructural protein sigma1s is required for establishment of viremia and systemic dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:19986–19991. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0907412106>.
55. Furlong DB, Nibert ML, Fields BN. 1988. Sigma 1 protein of mammalian reoviruses extends from the surfaces of viral particles. *J. Virol.* 62: 246–256.
56. Virgin HW, IV, Bassel-Duby R, Fields BN, Tyler KL. 1988. Antibody protects against lethal infection with the neurally spreading reovirus type 3 (Dearing). *J. Virol.* 62:4594–4604.
57. Risco C, Rodríguez JR, López-Iglesias C, Carrascosa JL, Esteban M, Rodríguez D. 2002. Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment membranes and vimentin filaments participate in vaccinia virus assembly. *J. Virol.* 76:1839–1855. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.76.4.1839-1855.2002>.
58. Fontana J, Tzeng WP, Calderita G, Fraile-Ramos A, Frey TK, Risco C. 2007. Novel replication complex architecture in rubella replicon-transfected cells. *Cell. Microbiol.* 9:875–890. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00837.x>.
59. Bozzola JJ, Russell LD. 1999. Specimen preparation for transmission electron microscopy, p 21–31. *In* Bozzola JJ, Russell LD (ed), *Electron microscopy: principles and techniques for biologists*, 2nd ed. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA.
60. Hayat MA. 2000. Principles and techniques of electron microscopy: biological applications, 4th ed. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
61. Sanz-Sánchez L, Risco C. 2013. Multilamellar structures and filament bundles are found on the cell surface during bunyavirus egress. *PLoS One* 8:e65526. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0065526>.
62. Fiala JC. 2005. Reconstruct: a free editor for serial section microscopy. *J. Microsc.* 218:52–61. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2818.2005.01466.x>.

Bunyamwera virus possesses a distinct nucleocapsid protein to facilitate genome encapsidation

Baobin Li^{a,1}, Quan Wang^{b,1}, Xijiang Pan^c, Isabel Fernández de Castro^d, Yuna Sun^e, Yu Guo^b, Xinwei Tao^a, Cristina Risco^d, Sen-Fang Sui^c, and Zhiyong Lou^{a,f,2}

^aLaboratory of Structural Biology, School of Medicine, ^fMinistry of Education Laboratory of Protein Science, and ^cState Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China; ^bCollege of Pharmacy and State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology, Nankai University, Tianjin 300071, China; ^dCell Structure Laboratory, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain; ^eNational Laboratory of Macromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China

Edited by Robert A. Lamb, Northwestern University, Evanston, IL, and approved March 12, 2013 (received for review December 26, 2012)

Bunyamwera virus (BUNV), which belongs to the genus *Orthobunyavirus*, is the prototypical virus of the *Bunyaviridae* family. Similar to other negative-sense single-stranded RNA viruses, bunyaviruses possess a nucleocapsid protein (NP) to facilitate genomic RNA encapsidation and virus replication. The structures of two NPs of members of different genera within the *Bunyaviridae* family have been reported. However, their structures, RNA-binding features, and functions beyond RNA binding significantly differ from one another. Here, we report the crystal structure of the BUNV NP–RNA complex. The polypeptide of the BUNV NP was found to possess a distinct fold among viral NPs. An N-terminal arm and a C-terminal tail were found to interact with neighboring NP protomers to form a tetrameric ring-shaped organization. Each protomer bound a 10-nt RNA molecule, which was acquired from the expression host, in the positively charged crevice between the N and C lobes. Inhomogeneous oligomerization was observed for the recombinant BUNV NP–RNA complex, which was similar to the Rift Valley fever virus NP–RNA complex. This result suggested that the flexibility of one NP protomer with adjacent protomers underlies the BUNV ribonucleoprotein complex (RNP) formation. Electron microscopy revealed that the monomer-sized NP–RNA complex was the building block of the natural BUNV RNP. Combined with previous results indicating that mutagenesis of the interprotomer or protein–RNA interface affects BUNV replication, our structure provides a great potential for understanding the mechanism underlying negative-sense single-stranded RNA RNP formation and enables the development of antiviral therapies targeting BUNV RNP formation.

assembly | packaging

Bunyaviruses constitute the largest segmented negative-sense single-stranded RNA (–ssRNA) virus family, which is subdivided into *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus*, and *Tospovirus* genera (1). The genomes of *Bunyaviridae* members are featured by three segments, the large (L), middle (M), and small (S) segments (2, 3). The L segment encodes an RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), the M segment encodes a precursor of glycoproteins (Gn and Gc), and the S segment encodes a nucleocapsid protein (NP). Moreover, a few *Bunyaviridae* members possess a nonstructural protein (NSs and/or NSm) using an ambisense coding strategy by the S and M segments (4).

Similar to other –ssRNA viruses, all members of the *Bunyaviridae* family contain a ribonucleoprotein (RNP) complex composed of genomic RNA enwrapped by the NP (4). After entry into the cytoplasm through membrane fusion mediated by glycoproteins, the RNP is released from the virion and serves as the template with which the copackaged RdRp transcribes mRNAs from the viral genome in the RNP. In the later stage of virus replication, complementary positive-strand RNA (cRNA) is produced in the form of an RNP. The RNP serves as the template for replication that generates the viral genomic RNA in the form of an RNP ready to be packaged in the virion. Throughout the entire virus replication cycle of a –ssRNA virus, the genome-length viral RNA (cRNA or viral genomic RNA) is only present in the form of an RNP that

either serves as a template for RNA synthesis or is packaged in the virion. Therefore, RNP assembly is a critical step in –ssRNA virus replication.

All bunyaviruses encode NPs to facilitate genome encapsidation. However, the structure, function, and molecular weight of these NPs show distinct variations (Fig. S1). The crystal structure of the NP from the Crimean–Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV), which is a member of the *Nairovirus* genus, revealed an unusual metal-dependent DNA-specific endonuclease activity but shared high structural similarity to the N-terminal domain of the Lassa fever virus (LAFV) NP (1). Moreover, recent studies have revealed that the NP of the Rift Valley fever virus (RVFV; genus *Phlebovirus*) oligomerizes with distinct molecular architectures to facilitate RNA encapsidation (5–7). A monomeric structure of the RVFV NP that was purified using a denaturation/renaturation method was first reported, and a distinct architecture for RNA encapsidation in –ssRNA viruses was found (6). Subsequently, the structure of the RVFV NP purified under native conditions was determined, and the formation of a hexameric ring-shaped structure was revealed (5). The most significant difference between these two results appears in the conformations of the N terminus of the RVFV NP. In the monomeric RVFV NP, the N-terminal arm (the first 30 amino acids) folds backward to the core region, which allows the formation of a compact architecture for the entire molecule, whereas this N-terminal arm was found to extend to the adjacent molecule to form the ring-shaped architecture of the hexameric structure. The structures of the RVFV NP complexed with RNA of variable lengths have been determined recently, demonstrating that the flexibility of the N-terminal arm of the RVFV NP underlies higher-order RNP formation (7). Another interesting observation from crystallographic studies on all of the bunyavirus-encoded NPs is that all of them cannot properly protect the packaged RNA against exogenous RNases. This result is consistent with the finding that bound RNA can be well protected by NPs from nonsegmented –ssRNA viruses but not by NPs from segmented –ssRNA viruses (8, 9).

Bunyamwera virus (BUNV), which can cause severe hemorrhagic fever and other diseases in livestock and humans (10), is the prototypic member of both the *Orthobunyavirus* genus and the entire *Bunyaviridae* family. BUNV is also known to serve as an excellent model for studying the biology of other *Bunyaviridae* family members (11, 12). BUNV possesses a small NP with

Author contributions: C.R., S.-F.S., and Z.L. designed research; B.L., Q.W., X.P., I.F.d.C., Y.S., Y.G., X.T., and Z.L. performed research; B.L., Q.W., X.P., I.F.d.C., Y.S., Y.G., X.T., C.R., S.-F.S., and Z.L. analyzed data; and C.R., S.-F.S., and Z.L. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Data deposition: Crystallography, atomic coordinates, and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank, www.pdb.org (PDB ID code 4IJS).

¹B.L. and Q.W. contributed equally to this work.

²To whom correspondence should be addressed. E-mail: louzy@xtal.tsinghua.edu.cn.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1222552110/-DCSupplemental.

a molecular weight of 25 kDa (2). Numerous investigations have revealed its biochemical features. However, its potential oligomerization state, effect on virus replication, specificity and stoichiometry of RNA binding (12–15), detailed structure of the BUNV NP–RNA complex, and the underlying mechanism for RNP formation remain unclear. To further understand the NPs encoded by *Bunyaviridae* members, particularly the prototypic member of each genus belonging to the *Bunyaviridae* family, we determined the crystal structure of the BUNV NP–RNA complex. Our findings reveal a distinct virally encoded NP and provide insight into how NP oligomerization contributes to the regulation of RNP assembly.

Results

Recombinant BUNV NP Oligomerizes and Binds Cellular RNA. Previous studies have suggested that bunyavirus NPs cannot well protect the bound RNA against exogenous RNases (1, 5). These observations are consistent with the finding that the NPs of nonsegmented –ssRNA viruses can protect the bound RNA, in contrast to the NPs of segmented –ssRNA viruses, which cannot (9).

We first analyzed the RNA-binding and solution properties of the recombinant BUNV NP. We expressed the full-length BUNV NP (residues M1–M233) in *Escherichia coli* and purified it under physiological conditions. The retention volume of the target protein in size-exclusion chromatography peaks at 14.5 mL (Fig. 1), corresponding to a molecular weight greater than 100 kDa. An SDS/PAGE analysis indicated that the major peaks contained a protein that was the size expected for the BUNV NP (25 kDa), suggesting that no protein contamination occurred during purification. These results revealed that the recombinant BUNV NP existed as a higher-order oligomer in solution. Moreover, the ratio of the OD at 260 nm to that at 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) for the major peak was 1.35, which indicated that the recombinant BUNV NP oligomers possessed encapsidated nucleic acids.

As aforementioned, the NPs of segmented –ssRNA viruses, for example, bunyavirus, cannot well protect bound RNA against exogenous RNases. Therefore, we determined whether the BUNV NP

possessed a similar property. Surprisingly, although we incubated the preliminarily purified BUNV NP–RNA mixture with RNase at a final concentration of 0.2 mg/mL for 12 h at 16 °C, we observed that the bound RNA was not digested. An identical peak at an identical retention volume was observed from size-exclusion chromatography, and an identical OD_{260}/OD_{280} ratio was obtained from BUNV NP–RNA mixtures with or without RNase treatment. These results demonstrated that the BUNV NP can form a higher-order oligomer and protect the bound RNA against exogenous RNase. Therefore, we used this BUNV NP–RNA complex in subsequent analyses.

EM of the Recombinant BUNV NP–RNA Complex. Previous studies on the RVFV NP or NP–RNA complex indicated that the oligomerization state of the RVFV NP was inhomogeneous in solution, that is, pentamers and hexamers were found to be the most prevalent species of the digested endogenous viral RNP and recombinant NP–RNA complex (5–7). The recombinant BUNV NP–RNA complex was found to exist as a multimer; thus, we first analyzed the RNase-treated NP–RNA sample using negative-stain EM to assess the homogeneity of the oligomerization state of the BUNV NP–RNA complex in solution.

From a total of 300 images recorded by EM, we selected 4,037 particles that were categorized into 24 classes by a reference-free classification. The results indicated that the BUNV NP–RNA complex formed three types of higher-order ring-shaped oligomers with diameters ranging from 80 Å to 120 Å (Fig. 2A and B). These particles consisted of predominantly tetramers (2,363 particles, 59%), followed by pentamers (1,367 particles, 33%) and very few hexamers (107 particles, 3%) (Fig. 2C). This observation differed from that for the RVFV NP–RNA complex, for which the amount of pentameric and hexameric structures were found to be equivalent followed by a small amount of tetramers and other higher-order multimers (7).

The inhomogeneous oligomerization of the RVFV NP insignificantly affected the crystallization of the most abundant species (5, 7). Given that the tetramer was the major form of the BUNV NP–RNA complex in solution, we supposed that the contaminants, namely, the small amount of pentamers and hexamers, would not influence the crystallization of the BUNV NP–RNA complex. Thus, we used this purified sample for crystallographic study.

Overall Structure of the BUNV NP–RNA Complex. The BUNV NP–RNA complex was successfully crystallized, and the crystal structure was subsequently determined using the single-wavelength anomalous dispersion (SAD) method and refined to 3.2 Å resolution with a final R_{work} of 22.0% (R_{free} = 27.6%) (Table S1). Each protomer of the BUNV NP bound one 10-nt RNA, and four NP–RNA complexes formed a ring-shaped architecture with an inner diameters of 30 Å and outer diameters of 75 Å through the fourfold crystallographic axis. This finding was consistent with the results of EM analysis (Fig. 3 and Fig. S2).

The polypeptide of the BUNV NP possessed a compact body part with an additional N-terminal extension and a C-terminal tail and featured four key regions: an N-terminal arm (termed N arm, hereafter) (M1–A10), an N lobe (A11–S120), a C lobe (K121–K214), and a C-terminal tail (termed C tail, hereafter) (K215–M233) (Fig. 3C and Fig. S3). Topology comparison using DALI (16) and secondary-structure matching (17) did not generate evident structural homologs, suggesting a unique protein fold structure for virally encoded NPs. The compact body of the BUNV NP protomer consisted of the N and C lobes. The C lobe was predominantly composed of α -helices, whereas the N lobe consisted of four α -helices and two β -strands. The one-stranded N arm and the helical C tail winged the main body and participate in intermolecular interactions with the adjacent two protomers. The RNA-binding site was identified as a large positively charged crevice located at the interface of the N and C lobes with a 10-nt RNA molecule bound within the inner side of the tetrameric ring. Regarding the coexistence of tetramers, pentamers, and hexamers of the BUNV NP–RNA complex in solution, the length of the bound RNA ranged from 40 nt to 60 nt, which is consistent with previous results (12). The body parts of four

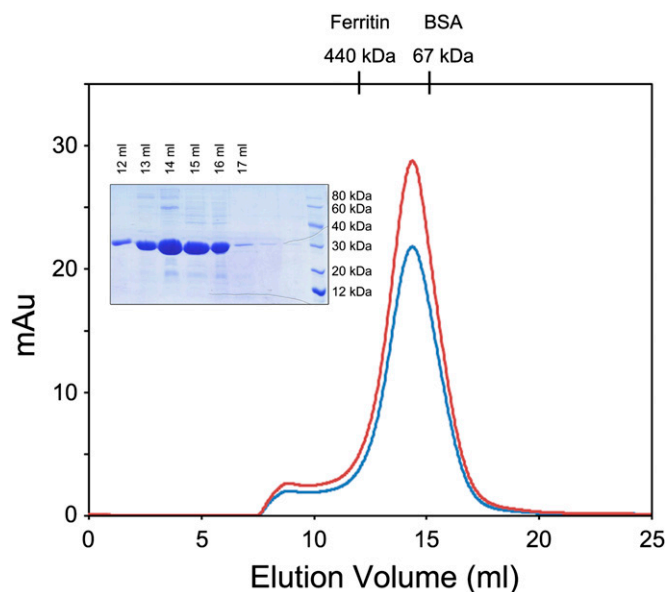


Fig. 1. Size-exclusion chromatography (SEC) of the BUNV NP–RNA complex with RNase pretreatment. The *E. coli*-expressed BUNV NP (0.2 mg) pretreated with RNase (0.2 mg/mL at 16 °C for 12 h) was injected onto a Superdex 200 HR 10/30 column. The absorbance at 260 and 280 nm are indicated in red and blue, respectively. The retention volume for the major peak was 14.5 mL. The retention volumes for the molecular-weight standards are shown above. SDS/PAGE analysis of the SEC elution fractions corresponding to the peaks is shown with standard protein markers.

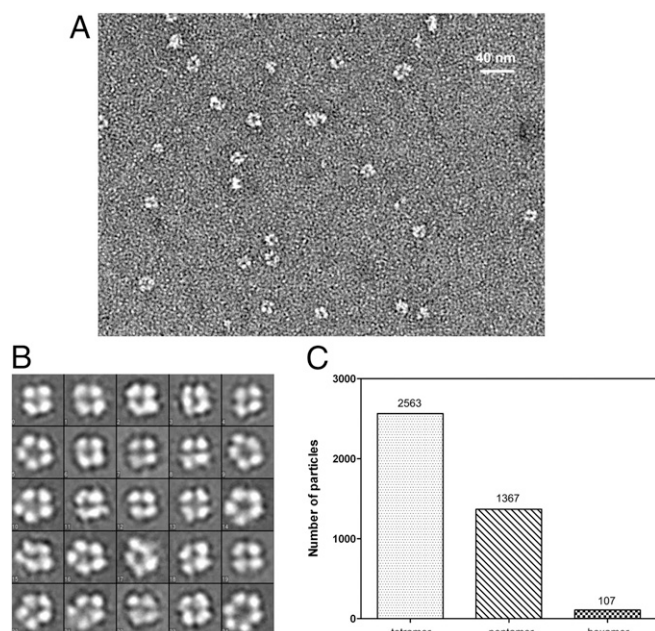


Fig. 2. EM analysis of the recombinant BUNV NP-RNA complex. (A) A typical EM version of the negatively stained BUNV NP-RNA complex. (B) The reference-free classifications of 4,037 BUNV NP-RNA particles in 24 classes (the length of the side of one square is 150 Å). The distribution of multimeric states is summarized in (C).

molecules in one asymmetric unit are nearly identical with rmsd values for the C α atoms of less than 0.7 Å, whereas the rmsd values for the C α atoms of N arms and C tails are approximate 2.0 Å, suggesting the flexibility of the N- and C-terminal extensions in the formation of NP-RNA oligomers.

NP-RNA Interaction. Consistent with the OD₂₆₀/OD₂₈₀ ratio during purification, the continuous experimental electron density map indicated the presence of an RNA molecule bound to the BUNV NP (Fig. S4). Each BUNV NP protomer clamped a 10-nt RNA molecule in the deep positively charged RNA-binding cavity located at the interface between the N and C lobes, in contrast to previous biochemical results (12, 15). Given that the bound RNA molecule in the NP-RNA complex was randomly acquired from the expression host, we used adenine to build the final model (Fig. 4).

The electron densities for the bases indicated that the RNA molecule in the tetrameric complex structure bound in a 5′–3′ direction in a clockwise orientation (Fig. 3A). The RNA strand was twisted clockwise along the inner perimeter of the tetrameric ring. The RNA-binding cleft formed the N lobe (top) and C lobe (bottom) interface. The first nucleotide pointed toward the solvent and stacked with the last base of the preceding NP protomer (N^{−1}) to form a ring-shaped structure. Nucleotides 1, 3, 4, and 5 were exposed to the solvent; nucleotides 2, 6, 7, 8, and 9 faced the protein, whereas nucleotide 10 was located in the cleft, that is, was exposed to the solvent between two NP protomers and did not contact the residues from the polypeptides of the NP (Fig. 4 and Fig. S5). The residues of the BUNV NP that interact with the RNA were primarily charged residues, including S14, S15, D18, R47, K50, T75, R94, Y176, R182, Q183, R184, and N217. These residues not only interacted with the ribose–phosphate backbone but also interacted with the bases to stabilize the bound RNA molecule.

Oligomerization of the BUNV NP Protomer. The assembled RNP comprised a large number of copies of the NP protein bound to genomic RNA (13). In the RNP, one NP protomer interacted with adjacent NP molecules to maintain the oligomeric architecture.

The interactions between the adjacent molecules within the tetrameric BUNV NP-RNA complex buried a total surface area of 1,300 Å² of the 14,000-Å² total surface area of one protomer, as calculated by PISA (17), which suggested strong interactions for the assembly of the higher-order oligomer. The most substantial interactions were contributed by the N arm (contact I) and C tail (contact II) with neighboring NP protomers (Fig. 5).

The one-stranded N arm of one protomer (N⁰) interacted with the two β -strands in the N lobe of the protomer on the right (N^{−1}) to form a three-stranded β -sheet, which constituted contact I. Within the contact-I region, a subset of hydrogen bonds was formed by residues E3–V9 of the N⁰ protomer with V61–L65 of the β 2-strand of the N^{−1} protomer to stabilize this intermolecular three-stranded β -sheet. Contact I contributed ~40% of the interaction surface of the total 1,300-Å² interprotomer interface, whereas the remaining interaction was provided by contact II. Contact II was formed by the C tails of N⁰ with the C lobe of a neighboring protomer (N^{−1}) on the left. Residues A222, F225, L226, F229, and I231 of the C tails of the N⁰ protomer, particularly their aliphatic side chains and aromatic rings, occupied the hydrophobic groove formed by the hydrophobic side chains of F158, L161, I165, L177, M181, W193, L198, V201, and L205 of the C lobe of the N^{−1} protomer. Similar to the interactions observed in the ring-shaped viral NP-RNA complex, contacts I and II were repeated in a directional manner such that the protomer was linked by contact I in a clockwise direction and by contact II in a counterclockwise direction, constituting the tetrameric ring of the BUNV NP-RNA complex. This structural information concerning the BUNV NP oligomerization was consistent with the results of mutagenesis analysis that mapped the homotypic interaction of the BUNV NP (14) and the finding that deletions of both the N arm and the C tail completely eliminated the ring-shaped oligomer in EM analysis.

Visualization of the Authentic BUNV RNP. The oligomerization state of the recombinant BUNV NP-RNA complex was found to be inhomogeneous in solution. Thus, we extracted natural RNP from BUNV virions and visualized it using negative-stain EM to verify the precise oligomerization state of the BUNV NP in vivo

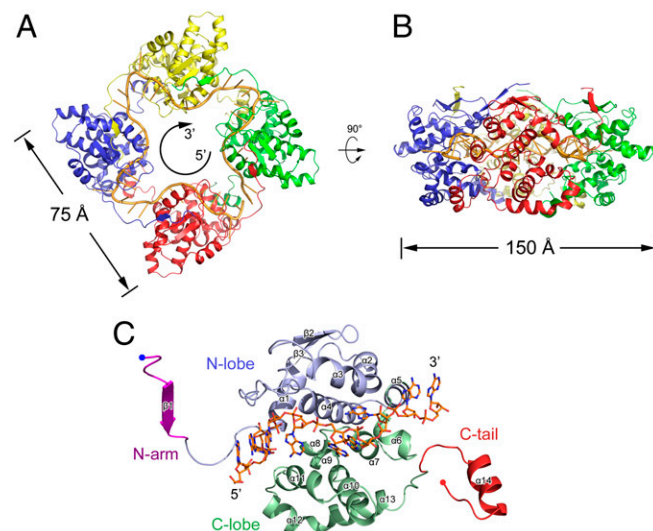


Fig. 3. Structure of the BUNV NP-RNA complex. The tetrameric ring of the BUNV NP-RNA complex is shown as a ribbon diagram from the top (A) and side (B) views. Each protomer is presented as a colored cartoon, and the bound RNA is shown as a yellow cartoon. The bound RNA presents a 5′–3′ clockwise orientation. The molecular dimensions are also indicated. (C) The structure of the BUNV NP monomer. The N arm, N lobe, C lobe, and C tail are shown in magenta, blue, green, and red, respectively. The N and C termini are indicated. The bound RNA is shown as colored sticks.

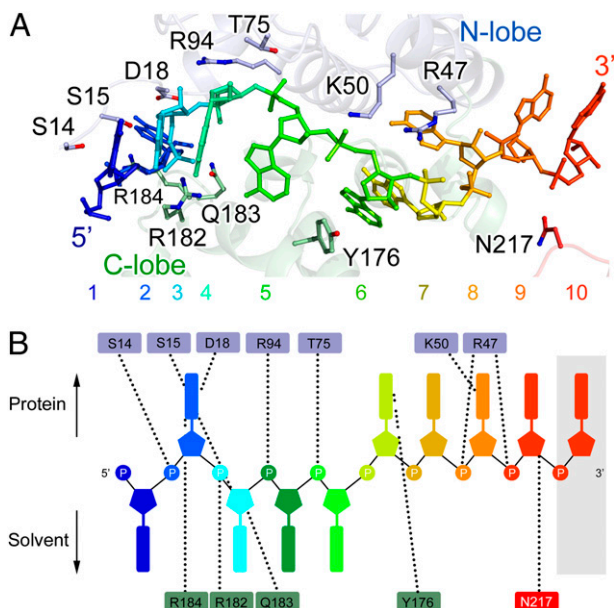


Fig. 4. The NP-RNA interaction. (A) A magnified side view of the interaction between the BUNV NP and bound RNA. RNA is shown as a colored stick in rainbow colors from the 5'- to 3'-end. The NP polypeptide is shown as a semi-transparent cartoon representation with an identical color scheme as that in Fig. 3C. The residues contacting the RNA are shown as colored sticks. (B) Schematic top view of the NP-RNA interactions. The last nucleotide located in the cleft exposed to the solvent between two NP protomers is shadowed. The dashed lines denote the contacts between the RNA and residues.

(Fig. 6A). BUNV virions released by infected BHK-21 cells were purified and treated with 1 M sucrose to open the virus particles and release the natural RNPs. These RNPs were not disrupted or modified by these isolation procedures. The RNPs extracted from BUNV virions demonstrated a relaxed structure without remarkable helical symmetry, which was similar to observations of the RVFV RNPs but clearly differed from those of the influenza virus or nonsegmented -ssRNA viruses, in which the RNP is supercoiled in structure (18). The width of the virion-extracted BUNV RNP is ~ 40 Å and was consistent with the size of an NP-RNA monomer in either the crystal structure or the 3D reconstruction that was obtained using cryonegative-staining EM (Fig. 6B and Fig. S6), suggesting that the monomer-sized NP-RNA complex was likely the building block of the relaxed BUNV RNP.

Discussion

BUNV is the prototypic virus of the *Orthobunyavirus* genus and the entire *Bunyaviridae* family. The structure of the BUNV NP-RNA complex allows a better understanding of the molecular mechanism underlying segmented -ssRNA RNP formation and the significant difference between NPs encoded by the members of each genus belonging to the *Bunyaviridae* family.

The crystal structure of the tetrameric BUNV NP-RNA complex reveals a distinct fold for virally encoded NPs and presents the predominant oligomeric state of the recombinant NP-RNA in solution. Although BUNV is a segmented -ssRNA virus, it possesses a distinct NP among segmented -ssRNA viruses but demonstrates structural similarity to NPs encoded by nonsegmented -ssRNA viruses. To date, the structures of four NPs of nonsegmented -ssRNA viruses are available: the tetrameric Borna disease virus NP (19) and the oligomeric NP-RNA rings of the rabies virus (20), vesicular stomatitis virus (21), and respiratory syncytial virus (22) that contain 10 or 11 NP protomers. Although the nucleotides bound by a single protomer and the position of RNA binding differ, these four nonsegmented -ssRNA -encoded NPs demonstrate clear structural homology. All of these NPs possess an N- and a C-terminal extension for interprotomer in-

teraction, in addition to conserved N and C lobes for RNA binding (Fig. S7, upper row). In contrast, the reported structures of segmented -ssRNA virus NPs differ, and the N- and C-terminal extensions for interprotomer interaction are not conserved (Fig. S7, lower row). The influenza A virus NP possesses a C-terminal tail loop, whereas the RVFV NP extends an N-terminal arm for oligomerization. Moreover, the LAFV NP and CCHFV NP do not demonstrate a clear structural element for multimerization. The BUNV NP clearly presents both an N- and a C-terminal extension, which play a central role in RNP formation in nonsegmented -ssRNA viruses. Another interesting structural observation is the presence of a large cleft at the interface of two protomers, exposing the last nucleotide to the solvent (Figs. S5 and S8). However, this cleft was not observed in other reported NP-RNA complex structures. We speculate that this cleft may represent the flexibility between two protomers during RNP formation.

The RNA binding of the BUNV NP was found to be similar to that of nonsegmented -ssRNA virus NPs. The BUNV NP possesses two clear N and C lobes in the central core that face each other to form a positively charged crevice for RNA binding. In the BUNV NP-RNA complex, the RNA is twisted around the inner perimeter of the tetrameric ring with individual bases facing either the solvent or the protein. In contrast, the RVFV NP sequestered the bases of only four nucleotides in a narrow hydrophobic pocket and interacted through polar contacts only with the ribose-phosphate backbone, which faced the solvent (7).

Furthermore, the presence of pentamers and hexamers in addition to the predominate tetramers that crystallized and the

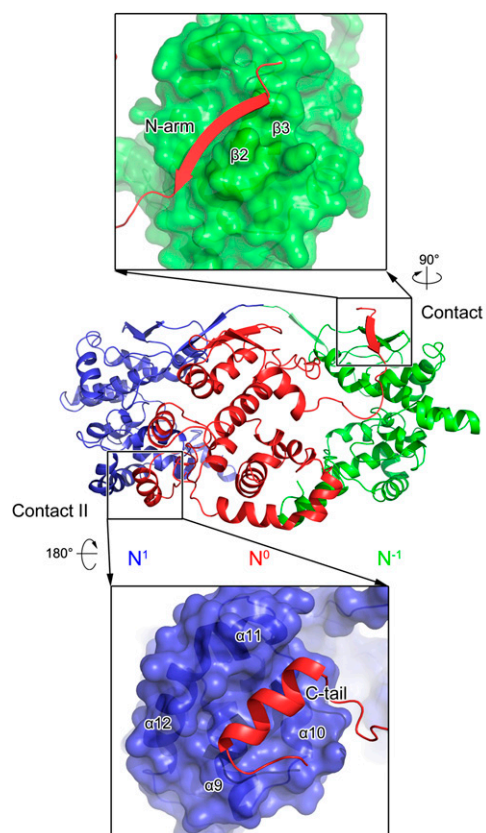


Fig. 5. Interprotomer interaction within the BUNV NP-RNA complex. Three adjacent molecules are shown as cartoons in blue, red, and green, respectively. Contacts I and II are labeled and detailed in the top and bottom panels. In the enlarged panels, the N^0 protomer is shown as a colored cartoon, whereas the N^1 and N^{-1} protomers are depicted as molecular surfaces. Two indicators show how the two magnified views are related in orientation to the original diagram in the center.

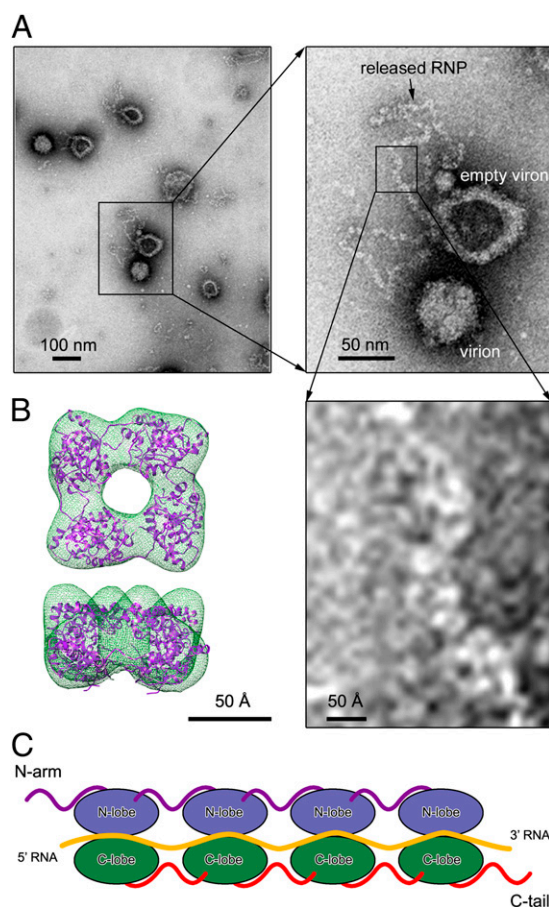


Fig. 6. The monomer-sized NP-RNA is the building block of natural BUNV RNPs. (A) Negative-stained EM image of the natural BUNV RNP extracted from bunyamwera viruses. The inset frames represent the enlarged regions. (B) The 3D reconstruction of the recombinant BUNV NP-RNA tetramer obtained using cryonegatively stained samples with docking of the crystal structure into the EM density map. (C) A model of the linear BUNV RNP formed using the monomer-sized NP-RNA as the building block. The color scheme for each structural element is identical to that used in Fig. 3C.

relaxed structure of the endogenous RNP as visualized by EM suggests that the multimer may not be the building block for the BUNV RNP (Fig. 6C). This feature was similar to that observed in the RVFV NP-RNA complex structures (7) but differed from that observed in the influenza virus and nonsegmented -ssRNA viruses (18). The monomeric BUNV NP-RNA complexes twisted to form a linear RNP with a flexible conformation between two protomers. We propose that flexibility within the hinge regions linking the N arm and C tail to the central core was responsible for the formation of this linear RNP during replication and transcription. Such a role for these regions would account for the essential nature of the residues in the hinge regions between the N arm and C tail and the central core, for example, F17 and W213, for BUNV replication (2).

Previous functional studies have revealed that the deletion of the last 17 residues of the BUNV NP (NP1-216) or the first 10 residues (NP11-233) can attenuate the oligomerization of the BUNV NP in a mammalian cell expression system, whereas the deletion of both N and C termini can significantly abolish the multimerization to monomer (14). This work also demonstrated that destroying the assembly of the NP complex can evidently abolish viral replication using a minireplicon system (14). Another systematic analysis of BUNV NP residues revealed that a subset of residues were critical for BUNV replication (2). Among them, the substitutions of F26, R94, I118, P125, G131, W134, Y141, F144, Y158, L160, Y176, L177, K179, Y185, W193, F225, L226, and I231, together with F17

and W213, can completely abolish virus rescue (2). Moreover, the deletions of the N- and C-terminal residues destroyed the interprotomer interactions, thereby attenuating RNP formation and BUNV replication. Consistent with the ratio of the surface area buried by the interaction of the N arm and C tail with neighboring protomers, deletion of the N or C termini alone cannot completely eliminate the intermolecular interaction, whereas the double deletion completely abolished oligomerization to monomer (14). Furthermore, F225, L226, and I231 of the N⁰ protomer projected their side chains into the hydrophobic pocket formed by Y158, L161, Y176, L177, and other residues from the N¹ protomer, thereby contributing to the interaction in contact II. Surprisingly, the single substitution of the residue from the N arm retained >65% minireplicon activity, and all mutated viruses were rescued (2), indicating that the hydrogen bond networks between the three-stranded β -sheet formed by the N arm and β 2 and β 3 of an adjacent protomer were essential to BUNV RNP formation. In addition, R94, P125, K179, Y185, and W193 all interacted with the bound RNA or contributed to the formation of the structural motif to stabilize the bound RNA, thereby significantly affecting BUNV RNP formation and viral replication. Notably, most of the residues essential to BUNV replication by RNP formation are conserved among the members of different serotypes of the *Orthobunyavirus* genus (Fig. S9). During the preparation of this manuscript, another group determined the crystal structure of the NP-RNA complex from Leanyer virus (LEAV), which is a member of the *Orthobunyavirus* genus and was isolated from arthropods in Australia (23). In addition to the high primary sequence conservation (42% sequence identity), the monomer fold of the BUNV NP and LEAV NP are highly homologous with an rmsd value of 1.4 Å for α atoms of 204 residues (Fig. S10A). Moreover, the architectures of the ring-shaped tetramers of the recombinant BUNV and LEAV NP-RNA complex in addition to the key residues for BUNV NP and LEAV NP oligomerization, RNA binding, and viral replication were also very similar (Fig. S10B and C). Interestingly, one BUNV NP protomer binds a 10-nt RNA molecule, which is in contrast with the 11-nt RNA molecule bound to LEAV NP protomer. This difference suggests that the numbers of nucleotides bound to different orthobunyaviral NP protomers may be variable. All of these results suggest a conserved network for RNP formation in this genus, which suggests its potential role in discovering wide-spectrum anti-*Orthobunyavirus* therapeutics.

In summary, the crystal structure and EM visualization of the BUNV NP-RNA complex clearly present how orthobunyaviruses encapsidate their genomic RNA and form the RNP. This information also aids in understanding the structural and functional differences among NPs encoded by bunyavirus or segmented -ssRNA viruses, which can benefit the development of antiviral therapies targeting RNP formation.

Materials and Methods

The gene of the full-length BUNV NP (residues 1-233) was cloned into the pQE-30 expression vector with a 6 \times His tag fused at the N terminus following a general protocol. The target protein was expressed and purified as previously described (13) with a few modifications (SI Materials and Methods). The purified BUNV NP-RNA complex was concentrated to 10 mg/mL and stored at 193 K. The crystals for the native BUNV NP were obtained in a reservoir solution containing 100 mM sodium malonate (pH 7.0) and 10% (wt/vol) PEG 3350. The selenomethionine derivatives of the BUNV NP were purified following a general procedure (24) and then crystallized under conditions similar to those used for the native protein. The selenomethionine SAD data set of the BUNV NP-RNA complex was collected to 4.0 Å at the wavelength corresponding to the Se peak at the Photon Factory beamline BL17A. All datasets were processed using the HKL2000 package (25). The SAD data phases were calculated and substantially improved by solvent flattening using the PHENIX program (26). The coordinates and structure factors were deposited in the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics under the Protein Data Bank ID code 4JUS. For visualization of the recombinant BUNV NP-RNA complex using EM, the samples were prepared by negative staining with uranyl acetate and imaged using an FEI Tecnai 20 electron microscope with a 2 k \times 2 k Gatan CCD camera at a magnification of 50,000 \times using a defocus value of \sim 1.5 μ m. Two-dimensional

class averages and 3D reconstructions were calculated using the Electron Micrograph Analysis (EMAN) software package (27). For the EM analysis of natural BUNV RNPs, Bunyamwera virions released by infected BHK-21 cells were produced and purified as previously described (28). The purified virions were adsorbed to EM grids and incubated for 3 min with 1 M sucrose in TEN buffer [0.01 M Tris-HCl (pH 7.4) with 0.1 M NaCl and 1 mM EDTA] before negative staining with 2% uranyl acetate for 30 s. The samples were subsequently imaged in a JEOL JEM 1011 electron microscope operating at 100 kV.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Dr. Richard M. Elliott for generous help in providing the BUNV NP expression plasmid and the staff of the Photon Factory for their assistance with the diffraction data collection. We also thank Dr. Gang Ji (Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences) for his assistance with EM data collection. This work was supported by Ministry of Science and Technology of China 973 Project Grants 2013CB911103 and 2010CB833600; National Natural Science Foundation of China Grants 31000332, 31170678, and 31230016; and Key Projects in the National Science and Technology Pillar Program Grants 10ZCKFSY07200 and 10ZCKFSY08700.

- Guo Y, et al. (2012) Crimean-Congo hemorrhagic fever virus nucleoprotein reveals endonuclease activity in bunyaviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(13):5046–5051.
- Eifan SA, Elliott RM (2009) Mutational analysis of the Bunyamwera orthobunyavirus nucleocapsid protein gene. *J Virol* 83(21):11307–11317.
- Elliott RM (1990) Molecular biology of the Bunyaviridae. *J Gen Virol* 71(Pt 3):501–522.
- Jiao Y, et al. (2012) Preparation and evaluation of recombinant severe fever with thrombocytopenia syndrome virus nucleocapsid protein for detection of total antibodies in human and animal sera by double-antigen sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 50(2):372–377.
- Ferron F, et al. (2011) The hexamer structure of Rift Valley fever virus nucleoprotein suggests a mechanism for its assembly into ribonucleoprotein complexes. *PLoS Pathog* 7(5):e1002030.
- Raymond DD, Piper ME, Gerrard SR, Smith JL (2010) Structure of the Rift Valley fever virus nucleocapsid protein reveals another architecture for RNA encapsidation. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(26):11769–11774.
- Raymond DD, Piper ME, Gerrard SR, Skiniotis G, Smith JL (2012) Phleboviruses encapsidate their genomes by sequestering RNA bases. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(47):19208–19213.
- Sun Y, Guo Y, Lou Z (2012) A versatile building block: The structures and functions of negative-sense single-stranded RNA virus nucleocapsid proteins. *Protein Cell* 3(12):893–902.
- Kranzusch PJ, Whelan SP (2012) Architecture and regulation of negative-strand viral enzymatic machinery. *RNA Biol* 9(7):941–948.
- Calisher CH, Sever JL (1995) Are North American Bunyamwera serogroup viruses etiologic agents of human congenital defects of the central nervous system? *Emerg Infect Dis* 1(4):147–151.
- Tauro LB, Diaz LA, Almirón WR, Contigiani MS (2009) Infection by Bunyamwera virus (Orthobunyavirus) in free ranging birds of Cordoba city (Argentina). *Vet Microbiol* 139(1–2):153–155.
- Mohl BP, Barr JN (2009) Investigating the specificity and stoichiometry of RNA binding by the nucleocapsid protein of Bunyamwera virus. *RNA* 15(3):391–399.
- Rodgers JW, Zhou Q, Green TJ, Barr JN, Luo M (2006) Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the nucleocapsid protein of Bunyamwera virus. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 62(Pt 4):361–364.
- Leonard VH, Kohl A, Osborne JC, McLees A, Elliott RM (2005) Homotypic interaction of Bunyamwera virus nucleocapsid protein. *J Virol* 79(20):13166–13172.
- Walter CT, Bento DF, Alonso AG, Barr JN (2011) Amino acid changes within the Bunyamwera virus nucleocapsid protein differentially affect the mRNA transcription and RNA replication activities of assembled ribonucleoprotein templates. *J Gen Virol* 92(Pt 1):80–84.
- Holm L, Rosenstrom P (2010) Dali server: Conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res* 38(Web Server issue):W545–549.
- Krissinel E, Henrick K (2004) Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60(Pt 12 Pt 1):2256–2268.
- Ruigrok RW, Crépin T, Kolakofsky D (2011) Nucleoproteins and nucleocapsids of negative-strand RNA viruses. *Curr Opin Microbiol* 14(4):504–510.
- Rudolph MG, et al. (2003) Crystal structure of the borna disease virus nucleoprotein. *Structure* 11(10):1219–1226.
- Albertini AA, et al. (2006) Crystal structure of the rabies virus nucleoprotein-RNA complex. *Science* 313(5785):360–363.
- Green TJ, Zhang X, Wertz GW, Luo M (2006) Structure of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein-RNA complex. *Science* 313(5785):357–360.
- Tawar RG, et al. (2009) Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus. *Science* 326(5957):1279–1283.
- Savji N, et al. (2011) Genomic and phylogenetic characterization of Leanyer virus, a novel orthobunyavirus isolated in northern Australia. *J Gen Virol* 92(Pt 7):1676–1687.
- Ren L, et al. (2011) Structural insight into substrate specificity of human intestinal maltase-glucoamylase. *Protein Cell* 2(10):827–836.
- Otwiniński Z, Minor W (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Macromolecular Crystallography, Part A, Methods in Enzymology*, eds Carter, Jr CW, Sweet RM (Academic, New York), Vol 276, pp 307–326.
- Adams PD, et al. (2002) PHENIX: Building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58(Pt 11):1948–1954.
- Ludtke SJ, Baldwin PR, Chiu W (1999) EMAN: Semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J Struct Biol* 128(1):82–97.
- Novoa RR, Calderita G, Cabezas P, Elliott RM, Risco C (2005) Key Golgi factors for structural and functional maturation of bunyamwera virus. *J Virol* 79(17):10852–10863.

Microreview

Virus factories: biogenesis and structural design

Isabel Fernández de Castro,[†] Luca Volonté[†] and Cristina Risco*

Cell Structure Lab, Centro Nacional de Biotecnología, CNB-CSIC, Darwin 3, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain.

Summary

Replication and assembly of many viruses occur in specific intracellular compartments known as 'virus factories'. Our knowledge of the biogenesis and architecture of these unique structures has increased considerably in the last 10 years, due to technical advances in cellular, molecular and structural biology. We now know that viruses build replication organelles, which recruit cell and viral components in a macrostructure in which viruses assemble and mature. Cell membranes and cytoskeleton participate in the biogenesis of these scaffolds and mitochondria are present in many factories, where they might supply energy and other essential factors. New inter-organelle contacts have been visualized within virus factories, whose structure is very dynamic, as it changes over time. There is increasing interest in identifying the factors involved in their biogenesis and functional architecture, and new microscopy techniques are helping us to understand how these complex entities are built and work. In this review, we summarize recent findings on the cell biology, biogenesis and structure of virus factories.

Introduction

Viruses are obligate intracellular parasites that depend on cell materials for their multiplication. In every single replication round, new viral genomic sequences are created in infected cells due to the mutation rates of viral RNA and DNA polymerases. Most of these mutations produce non-viable viruses, but some are the origin of new interactions between viral and cell factors, and can generate new

strategies for virus replication (Domingo *et al.*, 2012). In the course of this constant ongoing evolution, the signals that trigger the assembly of viral factories might have been selected because these structures provide clear advantages for the virus. The factory scaffold facilitates adequate spatial coordination of viral genome replication and assembly, with maximum efficiency in the use of cell resources. Factories could also provide sites for viruses to hide from host cell antiviral defences (Novoa *et al.*, 2005; Netherton and Wileman, 2011). Some viruses build factories inside the cell nucleus, although their organization is still poorly characterized. This is most likely due to our limited comprehension of the functional architecture of the cell nucleus (Peng *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2011). Most of our knowledge is derived from factories assembled in the cytosol, where they present two common features: (i) organization by recruitment of viral and cellular components around replication organelles built by viral replicases in cell endomembranes, and (ii) most factories recruit and use mitochondria.

Since the early reviews on virus factories and replication organelles (Mackenzie, 2005; Novoa *et al.*, 2005; Wileman, 2006), there has been considerable progress in their characterization, as shown in several excellent, recently published reviews that cover different aspects of the cell biology of viral replication (Den Boon and Ahlquist 2010; Nagy and Pogany, 2011; Netherton and Wileman, 2011). Progress has been possible thanks to technical advances in genomics, proteomics and microscopy techniques, and to growing interest in understanding how viruses take control of cells. In this review, we will focus on what we have learned in the past few years about the architecture of virus factories and the key cell factors involved in their biogenesis, dynamics and internal macromolecular transport.

Biogenesis and structure of replication organelles

Early in infection, viral polymerases and cofactors interact with cell membranes, where they build functional replication complexes (RC) and replication organelles (Miller and Krijnse-Locker, 2008). These complexes make multiple copies of the viral genome and transfer them to the assembly sites. Viruses assemble the RC in cell endomembranes; less often, they can use the plasma membrane as

Received 27 July, 2012; revised 31 August, 2012; accepted 4 September, 2012. *For correspondence. E-mail crisco@cnb.csic.es; Tel. (+34) 585 4507; Fax (+34) 585 4506.

[†]Joint first authors.

well. This is the case of alphaviruses and rubella virus (RUBV), two members of the *Togaviridae* family of RNA viruses that use the cytosolic face of the plasma membrane to pre-assemble their RC (Frolova *et al.*, 2010; Spuul *et al.*, 2010; Risco *et al.*, 2012). These complexes are later internalized and transported to lysosomes, where replication continues; it is not known why the togavirus viral replicases must travel to the plasma membrane to pre-assemble the RC. Another peculiar case has been described for vaccinia virus (VV), the best-characterized member of the *Poxviridae*. VV assembles 'mini-nuclei' with rough endoplasmic reticulum (RER) cisternae, where viral replication takes place (Tolonen *et al.*, 2001). Apart from these exceptional cases, most viruses that replicate in the cytosol assemble membranous structures that belong to three main categories: single-membrane spherules, tubulovesicular cubic membranes and planar oligomeric arrays (Fig. 1).

Built by viral non-structural proteins, viral RNA and cell cofactors, spherules are single-membrane vesicles with a narrow opening to the cytosol. They form as invaginations in a variety of organelles such as mitochondria, ER, lysosomes, peroxisomes, Golgi apparatus or chloroplasts (Novoa *et al.*, 2005; Nagy and Pogany, 2011) (Fig. 1A and B). The neck-like connection restricts the entry of undesirable molecules inside the spherule, protects the replicated genome from degradation and also controls exit of the newly synthesized viral genome. Typical spherules are those assembled by the turnip yellow mosaic virus (TYMV) in chloroplasts (Prod'homme *et al.*, 2001) (Fig. 1A), the brome mosaic virus (BMV) in ER-derived membranes (Schwartz *et al.*, 2002), the Semliki Forest virus in modified lysosomes (Zhao *et al.*, 1994) and the flock house virus (FHV) in mitochondria, which were the first replication organelles characterized in three dimensions (3D) by electron tomography (ET) (Kopek *et al.*, 2007).

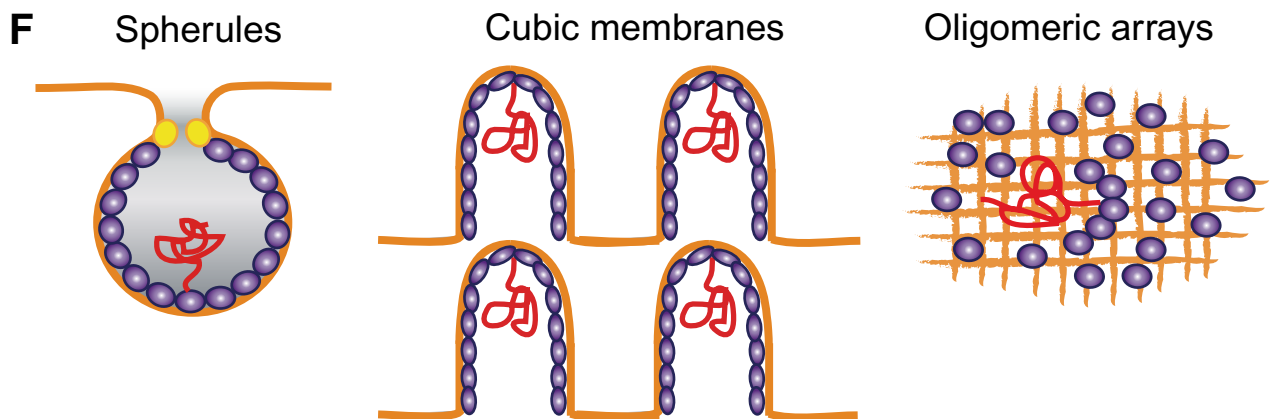
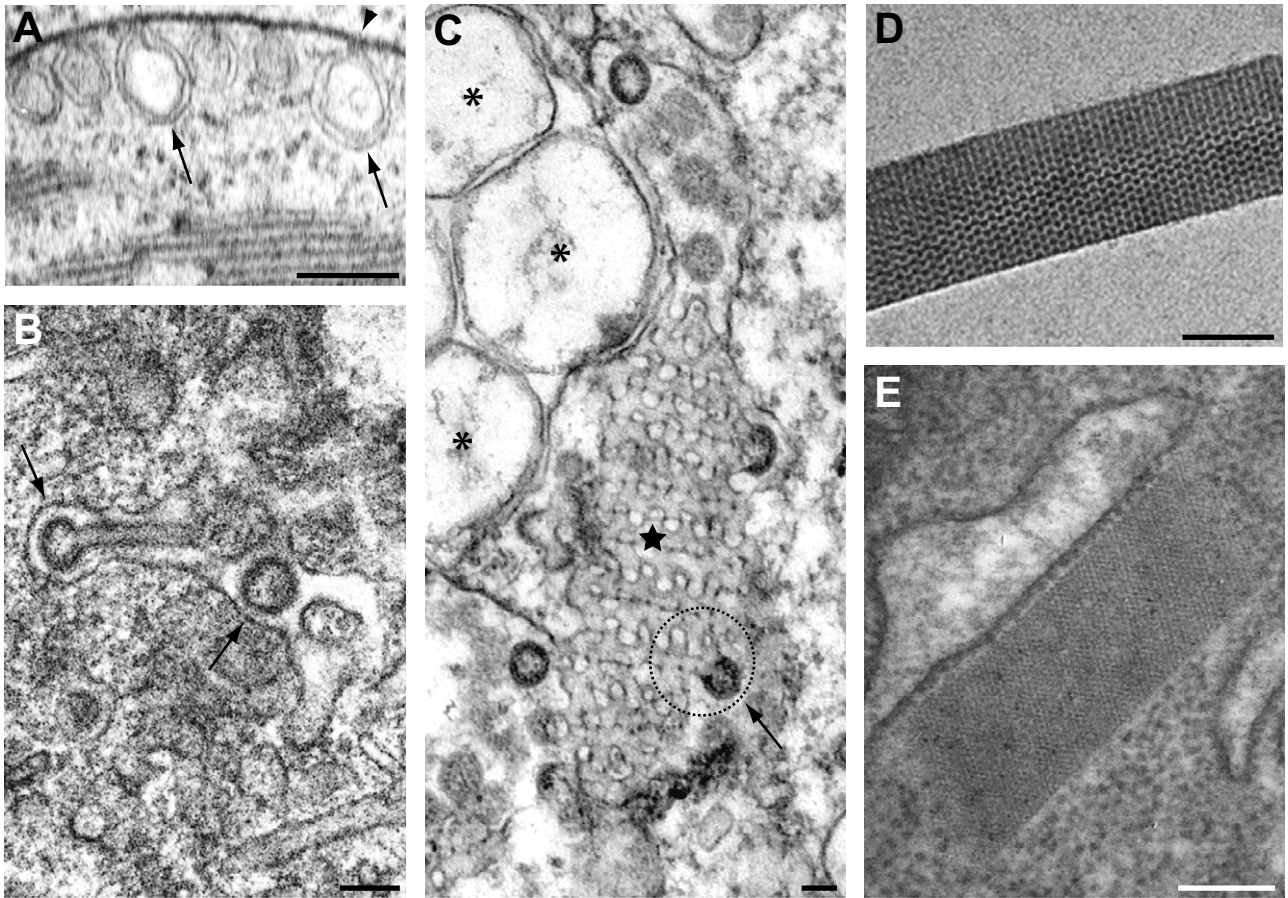
Bunyamwera virus (BUNV) assembles atypical spherules in Golgi membranes. BUNV is an RNA virus of negative sense polarity, and the best-characterized member of the *Bunyaviridae* (Elliott, 1997; Walter and Barr, 2011). The BUNV spherules are often seen attached to a cylindrical structure (Fig. 1B); these tubular elements have openings to the cytosol and grow in length over time. Their structural characterization both *in situ* and *in vitro* suggested that whereas the spherules are the site of viral genome replication, the cylinders might store and protect the replicated viral RNA while awaiting transport to the assembly sites in nearby Golgi membranes (Fontana *et al.*, 2008).

Also frequently detected in virus-infected cells and described in the literature with many different names, the membranous tubulovesicular structures (TBS) are indeed cubic membranes (Fig. 1C). These membranous webs, which most probably originate from the ER, are induced

basically by all types of viruses, RNA and DNA. They consist of highly curved, 3D-folded lipid bilayers that build a platform for viral replication and virion assembly. Deng and collaborators studied cubic membranes through mathematical 3D simulations to analyse how these structures can work as a virus factory. They concluded that the interconnected channels of the TBS could facilitate molecule transport from the viral RC to the cytoplasm or the nucleus; the pores of the outer surface would control entry of materials, and the highly curved nature of the TBS might facilitate virus budding (Deng *et al.*, 2010). In cells infected by the SARS CoV (severe acute respiratory syndrome coronavirus), the membranous webs are seen in contact with double membrane vesicles (DMV) and nascent virions (Goldsmith *et al.*, 2004) (Fig. 1C). DMV were first considered potential viral replication sites, but extensive analysis of 3D tomographic reconstructions did not reveal any membrane openings between DMV and the cytoplasm (Knoops *et al.*, 2008). Moreover, ultrastructural analysis of viral replicase and double-stranded RNA (dsRNA), which is an intermediate of RNA replication, suggested that the TBS is the site of viral genome replication, whereas DMV could play a different role such as storage of replicated viral RNA (Knoops *et al.*, 2008; 2012). In the case of polioviruses, the DMV support viral RNA replication, but only at long times post infection (p.i.); during the exponential phase of replication, viral RNA synthesis occurs in single-membrane webs (Belov *et al.*, 2012). DMV structure suggests that they might be autophagosomes, although this is still a matter of debate (Netherton and Wileman, 2011).

Dengue virus, a member of the family *Flaviviridae* and a very important human pathogen, assembles an ER-derived network with spherules that has been characterized by ET (Welsch *et al.*, 2009). The 3D views of these complex webs showed connections between the ER-derived spherules that harbour the RC and the assembly sites in nearby ER membranes. This study showed the potential of ET to illustrate how the different steps of the virus life cycle can be connected inside the factory.

A third class of membranous structures that harbour viral RC are planar 2D oligomeric arrays (Fig. 1D and E). Studies with polioviruses showed that RNA polymerases assemble 2D arrays *in vitro* (Hobson *et al.*, 2001; Lyle *et al.*, 2002), and further analysis indicated that viral polymerase molecules could have both structural and enzymatic roles in replication organelles *in situ* (Spagnolo *et al.*, 2010). Several studies suggested that oligomeric arrays of viral polymerases can assemble in cells. For example, transmission electron microscopy (TEM) of cells infected with coxsackievirus showed intracellular organized lattices (Fig. 1E), very similar to those assembled by the viral RNA polymerase *in vitro* (Kemball *et al.*, 2010). A






-  Virus polymerase
-  Virus RNA
-  Host factors

Fig. 1. Transmission electron microscopy of replication organelles.

- A. TEM of a plant cell infected with turnip yellow mosaic virus (TYMV). Arrows point to viral spherules, the structures that harbour the replication complex (RC), on the periphery of a chloroplast. The arrowhead indicates the neck-like connection that communicates the spherule with the cytoplasm.
- B. BHK-21 cell infected with Bunyamwera virus. Spherules (arrows) are associated with Golgi membranes. The spherule on the left is connected with a tubular structure.
- C. Tubuloreticular cubic membranes (star) in contact with double membrane vesicles (DMV; asterisks) in a Vero E6 cell infected with the SARS coronavirus. The dashed circle surrounds a group of curved membranes connected with a budding virus (arrow).
- D. Oligomeric lattice assembled *in vitro* by the poliovirus RNA-dependent RNA polymerase in the presence of RNA, visualized by negative staining and TEM.
- E. Lattice structure adjacent to the RER in a pancreatic acinar cell infected with coxsackievirus.
- Bars, 100 nm.
- F. Models showing our interpretation of the structures in the images.
- A, C, D and E, reproduced with permission from Prod'homme *et al.* (2001), Goldsmith *et al.* (2004), Lyle *et al.* (2002) and Kembell *et al.* (2010) respectively.

close relationship between self-interaction and replication activity is reported for viral polymerases of other viruses such as FHV (Dye *et al.*, 2005), hepatitis C virus (Qin *et al.*, 2002) and RUBV (Risco *et al.*, 2012). It thus appears that close packing of viral polymerases might be necessary for RC activation and efficient viral replication in cells.

To build their replication organelles, viruses must take control of cell endomembranes, which they do by interfering with lipid metabolism, protein regulation, targeting and transport. The assembly of virus-induced cubic membranes could be linked to changes in cell cholesterol metabolism and trafficking (Deng *et al.*, 2010). Other viruses depend on phosphatidylcholine synthesis, fatty acid synthesis or geranylation (Netherton and Wileman, 2011). For enteroviruses and flaviviruses, a local increase in phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4-P) levels is necessary to maintain the integrity of the membranous viral RC. Virus non-structural proteins recruit and activate PI4 kinases; this increases local production of PI4-P, which then mediates the incorporation of more replicase molecules (Hsu *et al.*, 2010; Reiss *et al.*, 2011). Recruitment of PI4 kinase might be mediated by the Arf1 GTPase and its guanine nucleotide exchange factor GBF1, a process modulated by specific viral proteins (Hsu *et al.*, 2010; Nagy and Pogany, 2011).

Other cell factors involved in RC assembly are the ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) and the reticulon homology proteins, both involved in membrane bending and remodelling (Barajas *et al.*, 2009; Díaz *et al.*, 2010), SNARE (soluble NSF attachment protein receptor) proteins, mediators of vesicle fusion and involved in ER-to-Golgi transport (Pierini *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011), chaperones, essential for the folding, stability and insertion of viral replication proteins into cell membranes (Pogany *et al.*, 2008), and prolyl isomerases (PPIases), which affect the folding, processing and stability of RC components (Watashi *et al.*, 2005; Kaul *et al.*, 2009).

Membrane rearrangements are induced by both enveloped and non-enveloped viruses. This suggests that viral

replication relies on the physical support of cell membranes, even for those viruses that do not incorporate membranes in their viral particles.

Organelle recruitment

Expression of viral polymerases and assembly of replication complexes are usually sufficient for organelle recruitment (Fontana *et al.*, 2007). Some viruses build a single large factory (Novoa *et al.*, 2005) that causes major reorganization of cell content, as visualized by confocal microscopy (Fig. 2A and B). These large structures have a diameter of several microns and can be studied in 3D after serial sectioning, TEM and image processing (Fontana *et al.*, 2008). Early in infection, Bunyamwera virus assembles a large factory, shown by confocal microscopy in Fig. 2B and in 3D reconstruction in Fig. 2C. With TEM resolution, we see that the Golgi complex, RER cisternae and mitochondria have changed their normal shape, size and location and transformed into a rounded network of membranes. Higher magnification views show that the structures harbouring the RC, which are atypical spherules (Fig. 1B), connect Golgi stacks with RER (Fig. 2D), nascent viruses (Fig. 2E) and mitochondria (Fontana *et al.*, 2008). These 'viral tubes' that harbour the RC thus also act as the physical link between the organelles of the factory, probably facilitating interchange of materials. Three-dimensional reconstructions of serial sections and TEM are very useful for studying these large structures, as they show how different components contact each other within the factory scaffold.

Instead of a single large factory, some viruses build several mini-factories by local recruitment of organelles and factors. This is the case of alphaviruses and RUBV, both of which use modified lysosomes, the viral replication organelles of togaviruses (Magliano *et al.*, 1998). Freeze-fracture and TEM showed massive recruitment of organelles such as mitochondria and RER around the RUBV replication organelle (Fig. 2F). Although cell organelles surround most of the periphery of the replication organelle, it maintains communication with the cytosol and

Fig. 2. Virus factories in 3D.

A–E. Confocal microscopy and 3D TEM of the large factory assembled by Bunyamwera virus in BHK-21 cells.

A and B. Control (A) and infected (B) cells were labelled with antibodies to protein disulfide isomerase (PDI), a marker of the rough endoplasmic reticulum (RER; red) and the viral glycoprotein (Gc; green). Nuclei were stained with DAPI (blue). Confocal microscopy (B) shows massive recruitment of RER elements around the factory.

C. Factory as visualized by TEM of serial sections, 3D reconstruction and image processing. Mitochondria (red) surround a network of RER (yellow) and Golgi (beige) membranes. Viral tubes, the structures that harbour the viral RC, are grey. N, nucleus.

D and E. Volumes at higher magnification, showing a viral tube attached to Golgi and RER membranes (D), and another near a viral particle (blue) (E).

Bars: A and B, 10 µm; E, 100 nm. C–E, reproduced with permission from Fontana *et al.* (2008).

F–I. Mini-factories of rubella virus in BHK-21 cells.

F. Freeze-fracture, metal replication and TEM shows the recruitment of mitochondria (mi) and RER around the replication organelle (asterisk), which is a modified lysosome. N, nucleus.

G. Three-dimensional model of the factory as visualized by ET. The replication organelle (yellow) is surrounded by RER (green) and presents an opening to the cytosol (arrow). A mitochondrion is coloured red.

H and I. Computational tomographic slices from different tomograms, showing contacts between the RER and the replication organelle (asterisks), seen as closely apposed membranes (arrow in H) and protein bridges (arrow in I).

Bars: F, 200 nm; H and I, 50 nm. F–I, reproduced with permission from Fontana *et al.* (2010).

J–O. Viral factories assembled by the giant mimivirus in amoeba cells.

J. Electron tomographic slice of an early replication factory at 4 h.p.i. (stage 1). Arrows point to viral cores.

K. Surface rendering of the boxed region in J, showing the two viral cores (yellow) surrounded by viral DNA (blue).

L. Thin section of a virus factory at 8 h.p.i. (stage 2) as visualized by TEM, revealing viral particles (arrows) at various assembly stages.

M. Three-dimensional views of a viral factory within an amoeba cell lysed at 8 h.p.i. and visualized by SEM.

N. SEM of a virus factory isolated at 8 h.p.i. The blue arrow indicates an immature virus particle and the white arrow, a mature particle.

O. SEM of a virus factory isolated at 10 h.p.i. (stage 3). Only mature viruses can be detected.

Bars: J, 200 nm; L and O, 500 nm; M, 2 µm; N, 300 nm. J, K, reproduced with permission from Mutsafi *et al.* (2010); L–O, from Zauberman *et al.* (2008).

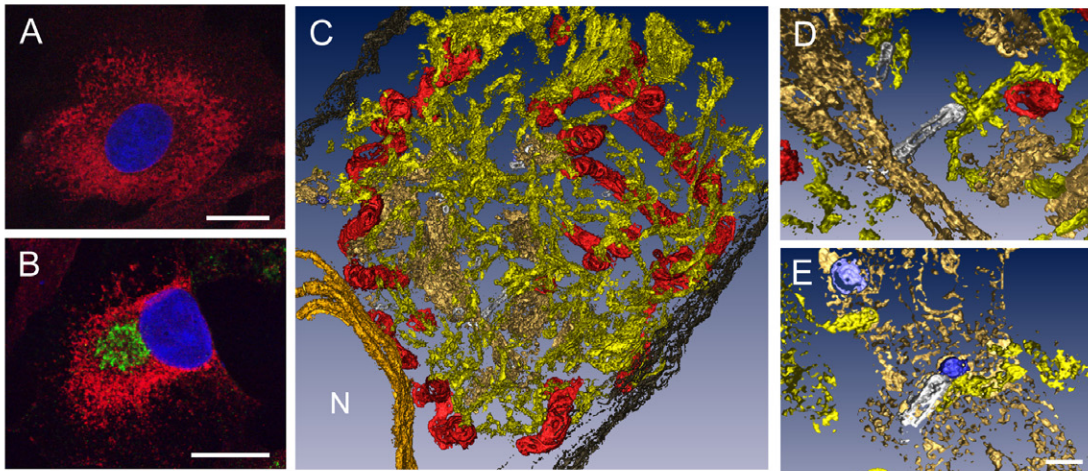
the endocytic pathway (Fontana *et al.*, 2010). Cells cryo-fixed by high-pressure freezing, a technique that provides outstanding ultrastructural preservation (Studer *et al.*, 2008), were analysed in 3D by ET; these studies revealed the inter-organelle contacts in RUBV factories in considerable detail (Fig. 2G–I). The RER usually surrounds the replication organelle (Fig. 2G), and there is constant interchange of molecules between these two compartments. RER sends newly synthesized viral proteins to the replication organelle, which transfers viral genomic and subgenomic RNA to the RER to continue protein synthesis (Lee and Bowden, 2000). This macromolecule interchange might be mediated by the two types of contacts detected in tomograms, consisting of closely apposed membranes (Fig. 2H) and protein bridges (Fig. 2I). The molecules that create these contacts have not been identified, although their dimensions point to the tethering proteins that function in inter-organelle communication. Curiously, organelle attachment is not accompanied by membrane fusion; this has been observed not only for RER, but also for mitochondria and for the RUBV assembly organelle, the Golgi complex (Fontana *et al.*, 2010).

As mentioned above, mitochondria are recruited to many virus factories. Their main role might be to act as an energy source for virus needs. In certain cases, they can also function as a replication organelle (Kopek *et al.*, 2007; Pathak *et al.*, 2008) or for virus assembly (Garzon *et al.*, 1990; Lanman *et al.*, 2008). Recent data show that mitochondria can provide additional host replication factors. Among these, p32, a mitochondrial matrix protein that participates in a number of apoptotic pathways (Itahana and Zhang, 2008), leaves the mitochondria in

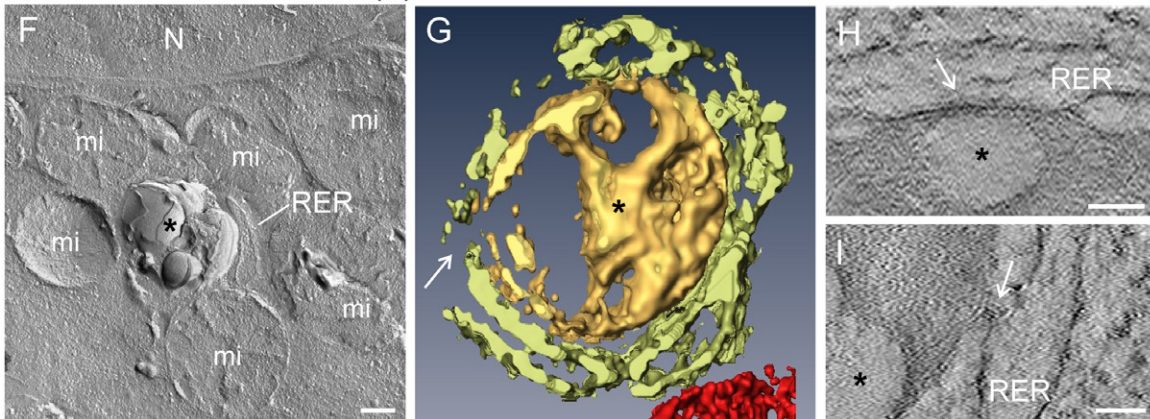
RUBV-infected cells and in cells transfected with RUBV replicons, and is incorporated into replication organelles (Fontana *et al.*, 2007; Ilkow *et al.*, 2010). p32 is detected in the internal membranes of the RUBV replication organelle, where viral polymerase and dsRNA molecules are also found (Fontana *et al.*, 2010). p32 participates in mitochondria recruitment (Claus *et al.*, 2011) and binds to the RUBV capsid, an interaction that enhances virus replication by a still unknown mechanism. Transcription of the RUBV subgenomic RNA in fact appears to depend on p32 binding to the RUBV capsid (Mohan *et al.*, 2002; Beatch *et al.*, 2005). p32 interacts with proteins from other viruses, such as the human immunodeficiency virus 1 (HIV-1), herpes simplex virus, adenovirus, Epstein-Barr virus and HCV, known in all these cases to be advantageous for viral replication (Ghebrehiwet *et al.*, 2001). The list of mitochondrial proteins identified as important for tombusvirus replication includes the MSP1 ATPase, as well as MAM33, which participates in oxidative phosphorylation and interacts with the p33 viral replicase, the inner mitochondrial membrane protein MDM38, which binds to viral RNA and stimulates viral replication, and TUM1, which also interacts with p33 (Nagy and Pogany, 2010).

The identification of factors involved in mitochondria recruitment and modification in virus-infected cells can give us important clues to understanding the biogenesis of virus factories. The only signalling pathway involved in factory biogenesis identified so far is that of aggresomes, used by large DNA viruses such as the African swine fever virus (ASFV), the poxviruses and the iridovirus frog virus 3 (Rojo *et al.*, 1998; Novoa *et al.*, 2005). The aggresome

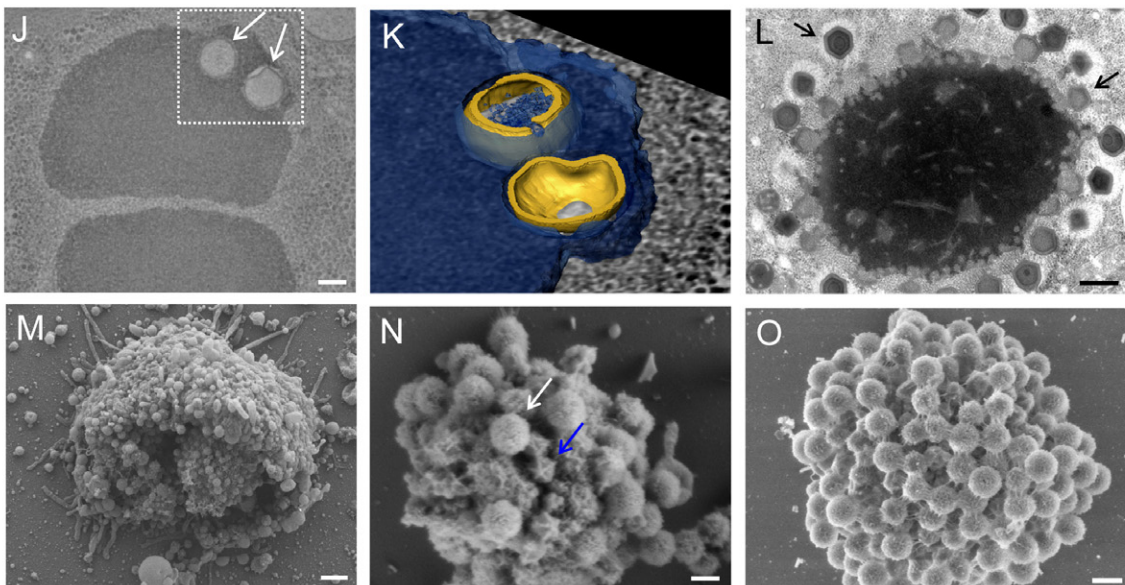
Bunyavirus - ssRNA (-)



Rubella virus - ssRNA(+)



Mimivirus - dsDNA



is a cell response to protein misfolding and aggregation (Kopito, 2000). Virus factories and aggresomes both assemble at the microtubular organizing centre (MTOC), recruit cell chaperones and mitochondria, and build a cage of vimentin filaments, a structure that is maintained by the activity of dynein motors on microtubules (Netherton and Wileman, 2011). Herpesviruses, adenoviruses and simian virus 40 seem to use aggresome-like structures termed promyelocytic leukaemia nuclear bodies (PML-NB) as sites for the assembly of nuclear factories (Maul *et al.*, 2000); however, recent work suggested that additional elements participate in the biogenesis of the nuclear factory of polyomaviruses (Erickson *et al.*, 2012). It is proposed that viruses kidnap the aggresome pathway to concentrate the numerous factors needed for replication and morphogenesis, and to avoid being recognized by cell defences. Alternatively, viral macromolecular complexes could be mistaken for misfolded proteins by the cell, which would then trigger the aggresome response (Netherton and Wileman, 2011).

Structural transformation of viral factories: from viral replication to morphogenesis

Virus factories have a dynamic structure that changes to accommodate virus needs. Although we do not know how these changes are coordinated, several examples have been studied by EM. Here we describe three of these, the bunyaviruses, poxviruses and mimiviruses. The compact, rounded structure built by BUNV during the replication phase (Fig. 2B and C) changes remarkably later in infection, coinciding with the assembly and maturation of new viral particles. Mitochondria and RER networks are removed from the perinuclear region, and secretory vesicles bearing the virus progeny move towards the cell surface (Fontana *et al.*, 2008). The VV factory changes several times during the course of infection (Novoa *et al.*, 2005). For viral genome replication, the virus first assembles cytoplasmic mini-nuclei with attached mitochondria (Tolonen *et al.*, 2001); virus morphogenesis then starts an aggresome-like structure (Risco *et al.*, 2002), where immature viruses assemble using an atypical membrane remodelling mechanism that has been characterized by ET (Chlanda *et al.*, 2009). Final envelopment and viral maturation takes place in Golgi stacks (Schmelz *et al.*, 1994).

Like poxviruses, mimiviruses undergo their entire life cycle in the infected cell cytoplasm (Mutsafi *et al.*, 2010). The early factories of these giant viruses can be seen at 4 h.p.i. (hours post infection). They are built by viral cores that release the DNA into the cytosol, where replication starts (Mutsafi *et al.*, 2010). Each core seeds its own factory, and ET shows that factories remain around their seeding cores (Fig. 2J and K). When factories expand at

late infection stages, they fuse to form a single factory with a very different appearance, where assembly begins and viruses at various assembly stages can be distinguished (Zauberman *et al.*, 2008) (Fig. 2L). Scanning electron microscopy (SEM) showed the structure of these factories in 3D. Images of factories isolated at 8 h.p.i. have both immature and mature particles (Fig. 2M and N), but 2 h later, only mature viruses are detected (Fig. 2O). Mimiviruses have a core containing a dsDNA genome, an icosahedral capsid and a lipid membrane. The factory is not surrounded by membranes, but the assembly of new viral particles is predicted to require membrane recruitment, as the mature viruses have a lipid envelope (Xiao *et al.*, 2005). The origin of such membranes is an open question for mimiviruses and other nucleocytoplasmic large DNA viruses, including the extensively characterized VV.

Movement of macromolecular complexes

Inside virus factories, cellular and viral macromolecules must be transported efficiently to concentrate all necessary materials and to connect viral genome replication with assembly and exit of mature virions. Viruses thus need to take control of the cell's trafficking machinery. Returning to the replication organelles and virus factories (Figs 1 and 2), one might wonder how molecules are able to move in and out these structures. Viruses can use the cytoskeleton and associated motor proteins as well as the host endomembrane system for intracellular movement (Boevink and Oparka, 2005; Greber and Way, 2006; Radtke *et al.*, 2006; Harries *et al.*, 2010; Harries and Ding, 2011). Plant viruses encode movement proteins (MP) that transport the viral genome from cell to cell through plasmodesmata (Niehl and Heinlein, 2011). In addition to MP, other categories of viral proteins are involved in intracellular movement of macromolecules in plant cells, including some that work in viral replication (Schoelz *et al.*, 2011). For example, the viral replication complexes of TMV and turnip mosaic virus localize to and traffic along microfilaments (Liu *et al.*, 2005; Harries and Ding, 2011). The movement of these viral components along actin filaments suggests involvement of the myosins, a large superfamily of microfilament-associated molecular motors. For intracellular movement, animal viruses also use vesicular transport, microtubules, microfilaments and associated motors (Greber and Way, 2006; Radtke *et al.*, 2006; Iwasaki and Omura, 2010). Actin and myosin have been detected in the replication organelles of Bunyamwera virus (Fontana *et al.*, 2008). Treatment with drugs that inhibit these proteins suggests that the actin-myosin complex mediates transport of the viral genome out of the RC, although direct demonstration is still needed (Fontana *et al.*, 2008).

Numerous aspects of viral subparticle transport inside cells remain unknown, for example, how the replicated genome escapes from viral polymerases in replication organelles, how viruses move across distinct intracellular compartments, or whether the actomyosin network mediates short-distance movements of viral complexes in cell endomembranes. A case of special complexity is that of herpesviruses, which must connect their factory inside the nucleus with a cytosolic factory by moving large DNA molecules in and out of the nucleus (Chang *et al.*, 2011). The characterization of these processes will increase our understanding of the cellular machinery involved in regulating intracellular trafficking of proteins and nucleic acids.

Conclusions and perspectives

Recent advances in proteomics, genomics and structural biology are helping us to address very complex interactions such as those that operate during virus factory construction. Although we are beginning to understand how replication organelles are assembled, information is still limited about how cell organelles are recruited, about the mechanisms of macromolecular transport between compartments, and about the signals that regulate the major structural changes in the factory during distinct stages in the virus life cycle. Even before we were able to understand all of these complex processes, scientists made the surprising discovery of the virophages, viruses that parasitize factories built by other viruses (La Scola *et al.*, 2008; Desnues *et al.*, 2012). This myriad of interactions is changing our concept of viruses as inert entities to that of 'live' organisms that have surely played a major role in the evolution of cells (Raoult and Forterre, 2008; Bandea, 2009; Feschotte and Gilbert, 2012).

Functional and mechanistic studies will be necessary to increase our current understanding of the biogenesis and structure of virus factories. Powerful new imaging technologies such as live-cell microscopy, super-resolution light microscopy and correlative light and electron microscopy (CLEM), together with new probes for *in situ* molecular mapping, will have increasing impact on this field (Van Weering *et al.*, 2010; Fu and Johnson, 2011; Huang *et al.*, 2011; Jouvenet *et al.*, 2011; Risco *et al.*, 2012). By deciphering how viruses build their factories, we will not only learn about viruses, but also about how cells position their proteins and regulate organelle shape, size and movement.

Acknowledgements

Our gratitude to Drs Isabelle Jupin, Cynthia Goldsmith, Karla Kirkegaard, Lindsay Whitton, Yael Mutsafi, Abraham Minsky, Juan Fontana and José Jesús Fernández for providing images and to Catherine Mark for editorial assistance. This work was

funded by a grant from the Ministry of Science and Innovation of Spain (BIO2009-07255 to C.R.).

References

- Bandea, C.I. (2009) *The origin and evolution of viruses as molecular organisms*. Nature Precedings [WWW document]. URL <http://hdl.handle.net/10101/npre.2009.3886.1>
- Barajas, D., Jiang, Y., and Nagy, P.D. (2009) A unique role for the host ESCRT proteins in replication of Tomato bushy stunt virus. *PLoS Pathog* **5**: e1000705.
- Beatch, M.D., Everitt, J.C., Law, L.J., and Hobman, T.C. (2005) Interactions between Rubella virus capsid and host protein p32 are important for virus replication. *J Virol* **79**: 10807–108020.
- Belov, G.A., Nair, V., Hansen, B.T., Hoyt, F.H., Fisher, E.R., and Ehrenfeld, E. (2012) Complex dynamic development of poliovirus membranous replication complexes. *J Virol* **86**: 302–312.
- Boevink, P., and Oparka, K.J. (2005) Virus–host interactions during movement processes. *Plant Physiol* **138**: 1815–1821.
- Chang, L., Godinez, W.J., Kim, I.-H., Tektonidis, M., de Lanerolle, P., Eils, R., *et al.* (2011) Herpesviral replication compartments move and coalesce at nuclear speckles to enhance export of viral late mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 136–144.
- Chlanda, P., Carbajal, M.A., Cyrklaff, M., Griffiths, G., and Krijnse-Locker, J. (2009) Membrane rupture generates single open membrane sheets during vaccinia virus assembly. *Cell Host Microbe* **6**: 81–90.
- Claus, C., Chey, S., Heinrich, S., Reins, M., Richardt, B., Pinkert, S., *et al.* (2011) Involvement of p32 and microtubules in alteration of mitochondrial functions by Rubella virus. *J Virol* **85**: 3881–3892.
- Den Boon, J.A., and Ahlquist, P. (2010) Organelle-like membrane compartmentalization of positive-strand RNA virus replication factories. *Annu Rev Microbiol* **64**: 241–256.
- Deng, Y., Almsherg, Z.A., Ng, M.M.L., and Kohlwein, S.D. (2010) Do viruses subvert cholesterol homeostasis to induce host cubic membranes? *Trends Cell Biol* **20**: 371–379.
- Desnues, C., Boyer, M., and Raoult, D. (2012) Sputnik, a virophage infecting the viral domain of life. *Adv Virus Res* **82**: 63–89.
- Díaz, A., Wang, X., and Ahlquist, P. (2010) Membrane-shaping host reticulon proteins play crucial roles in viral RNA replication compartment formation and function. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 16291–16296.
- Domingo, E., Sheldon, J., and Perales, C. (2012) Viral quasispecies evolution. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**: 159–216.
- Dye, B.T., Miller, D.J., and Ahlquist, P. (2005) *In vivo* self-interaction of nodavirus RNA replicase protein A revealed by fluorescence resonance energy transfer. *J Virol* **79**: 8909–8919.
- Elliott, R.M. (1997) Emerging viruses: the Bunyaviridae. *Mol Med* **3**: 572–577.
- Erickson, K.D., Bouchet-Marquis, C., Heiser, K., Szomolanyi-Tsuda, E., Mishra, R., Lamothe, B., *et al.* (2012) Virion

- assembly factories in the nucleus of polyomavirus-infected cells. *PLoS Pathog* **8**: e1002630.
- Feschotte, C., and Gilbert, C. (2012) Endogenous viruses: insights into viral evolution and impact on host biology. *Nat Rev Genet* **13**: 283–296.
- Fontana, J., Tzeng, W.-P., Calderita, G., Fraile-Ramos, A., Frey, T.K., and Risco, C. (2007) Novel replication complex architecture in rubella replicon-transfected cells. *Cell Microbiol* **9**: 875–890.
- Fontana, J., López-Montero, N., Elliott, R.M., Fernández, J.J., and Risco, C. (2008) The unique architecture of Bunyamwera virus factories around the Golgi complex. *Cell Microbiol* **10**: 2012–2028.
- Fontana, J., López-Iglesias, C., Tzeng, W.-P., Frey, T.K., Fernández, J.J., and Risco, C. (2010) Three-dimensional structure of Rubella virus factories. *Virology* **405**: 579–591.
- Frolova, E.I., Gorchakov, R., Pereboeva, L., Ataheva, S., and Frolov, I. (2010) Functional Sindbis virus replicative complexes are formed at the plasma membrane. *J Virol* **84**: 11679–11695.
- Fu, C.-Y., and Johnson, J.E. (2011) Viral life cycles captured in three-dimensions with electron microscopy tomography. *Curr Opin Virol* **1**: 125–133.
- Garzon, S., Strykowski, H., and Charpentier, G. (1990) Implication of mitochondria in the replication of Nodamura virus in larvae of the Lepidoptera, *Galleria mellonella* (L.) and in suckling mice. *Arch Virol* **113**: 165–176.
- Ghebrehiwet, B., Lim, B.-L., Kumar, R., Feng, X., and Peerschke, E.I.B. (2001) gC1q-R/p33, a member of a new class of multifunctional and multicompartmental cellular proteins, is involved in inflammation and infection. *Immunol Rev* **180**: 65–77.
- Goldsmith, C.S., Tatti, K.M., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Comer, J.A., Lee, W.W., *et al.* (2004) Ultrastructural characterization of SARS coronavirus. *Emerg Infect Dis* **10**: 320–326.
- Greber, U.F., and Way, M. (2006) A superhighway to virus infection. *Cell* **124**: 741–754.
- Harries, P., and Ding, B. (2011) Cellular factors in plant virus movement: at the leading edge of macromolecular trafficking in plants. *Virology* **411**: 237–243.
- Harries, P.A., Schoelz, J.E., and Nelson, R.S. (2010) Intracellular transport of viruses and their components: utilizing the cytoskeleton and membrane highways. *Mol Plant Microbe Interact* **23**: 1381–1393.
- Hobson, S.D., Rosenblum, E.S., Richards, O.C., Richmond, K., and Kirkegaard, K. (2001) Oligomeric structures of poliovirus polymerase are important for function. *EMBO J* **20**: 1153–1163.
- Hsu, N.Y., Illynska, O., Belov, G., Santiana, M., Chen, Y.H., Takvorian, P.M., *et al.* (2010) Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell* **141**: 799–811.
- Huang, B., Babcock, H., and Zhuang, X. (2011) Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells. *Cell* **143**: 1047–1058.
- Ilkow, C.S., Weckbecker, D., Cho, W.J., Meier, S., Beatch, M.D., Goping, I.S., *et al.* (2010) The Rubella virus capsid protein inhibits mitochondrial import. *J Virol* **84**: 119–130.
- Itahana, K., and Zhang, Y. (2008) Mitochondrial p32 is a critical mediator of ARF-induced apoptosis. *Cancer Cell* **13**: 542–553.
- Iwasaki, K., and Omura, T. (2010) Electron tomography of the supramolecular structure of virus-infected cells. *Curr Opin Struct Biol* **20**: 632–639.
- Jouvenet, N., Simon, S.M., and Bieniasz, P.D. (2011) Visualizing HIV-1 assembly. *J Mol Biol* **410**: 501–511.
- Kaul, A., Stauffer, S., Berger, C., Pertel, T., Schmitt, J., Kallis, S., *et al.* (2009) Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics. *PLoS Pathog* **5**: e1000546.
- Kemball, C.C., Alirezai, M., Flynn, C.T., Wood, M.R., Harkins, S., Kiosses, W.B., and Whitton, J.L. (2010) Coxsackievirus infection induces autophagy-like vesicles and megaphagosomes in pancreatic acinar cells *in vivo*. *J Virol* **84**: 12110–12124.
- Knoops, K., Kikkert, M., Worm, S.H., Zevenhoven-Dobbe, J.C., van der Meer, Y., Koster, A.J., *et al.* (2008) SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol* **6**: e226.
- Knoops, K., Bárcena, M., Limpens, R.W., Koster, A.J., Mommaas, A.M., and Snijder, E.J. (2012) Ultrastructural characterization of arterivirus replication structures: reshaping the endoplasmic reticulum to accommodate viral RNA synthesis. *J Virol* **86**: 2474–2487.
- Kopeck, B.G., Perkins, G., Miller, D.J., Ellisman, M.H., and Ahlquist, P. (2007) Three-dimensional analysis of a viral RNA replication complex reveals a virus-induced mini-organelle. *PLoS Biol* **5**: e220.
- Kopito, R.R. (2000) Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol* **10**: 524–530.
- La Scola, B., Desnues, C., Pagnier, I., Robert, C., Barrasi, L., Fournous, G., *et al.* (2008) The viroplasm as a unique parasite of the giant mimivirus. *Nature* **455**: 100–104.
- Lanman, J., Crum, J., Deerinck, T.J., Gaietta, G.M., Schneemann, A., Sosinsky, G.E., *et al.* (2008) Visualizing flock house virus infection in Drosophila cells with correlated fluorescence and electron microscopy. *J Struct Biol* **161**: 439–446.
- Lee, J.-Y., and Bowden, D.S. (2000) Rubella virus replication and links to teratogenicity. *Clin Microbiol Rev* **13**: 571–587.
- Liu, J.Z., Blancaflor, E.B., and Nelson, R.S. (2005) The tobacco mosaic virus 126-kilodalton protein, a constituent of the virus replication complex, alone or within the complex aligns with and traffics along microfilaments. *Plant Physiol* **138**: 3439–3444.
- Liu, S.T., Sharon-Friling, R., Ivanova, P., Milne, S.B., Myers, D.S., Rabinowitz, J.D., *et al.* (2011) Synaptic vesicle-like lipidome of human cytomegalovirus virions reveals a role for SNARE machinery in virion egress. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 12869–12874.
- Lyle, J.M., Bullitt, E., Bienz, K., and Kirkegaard, K. (2002) Visualization and functional analysis of RNA-dependent RNA polymerase lattices. *Science* **296**: 2218–2222.
- Mackenzie, J. (2005) Wrapping things up about virus RNA replication. *Traffic* **6**: 967–977.

- Magliano, D., Marshall, J.A., Bowden, D.S., Vardaxis, S., Meanger, J., and Lee, J.Y. (1998) Rubella virus replication complexes are virus modified lysosomes. *Virology* **240**: 57–63.
- Maul, G.G., Negorev, D., Bell, P., and Ishov, A.M. (2000) Review: properties and assembly mechanisms of ND10, PML bodies, or PODs. *J Struct Biol* **129**: 278–287.
- Miller, S., and Krijnse-Locker, J. (2008) Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat Rev Microbiol* **6**: 363–374.
- Mohan, K.V., Ghebrehiwet, B., and Atreya, C.D. (2002) The N-terminal conserved domain of rubella virus capsid interacts with the C-terminal region of cellular p32 and overexpression of p32 enhances the viral infectivity. *Virus Res* **85**: 151–161.
- Mutsaers, Y., Zauberman, N., Sabanay, I., and Minsky, A. (2010) Vaccinia-like cytoplasmic replication of the giant mimivirus. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 5978–5982.
- Nagy, P.D., and Pogany, J. (2010) Global genomics and proteomics approaches to identify host factors as targets to induce resistance against *Tomato bushy stunt virus*. *Adv Virus Res* **76**: 123–177.
- Nagy, P.D., and Pogany, J. (2011) The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors. *Nat Rev Microbiol* **10**: 137–148.
- Netherton, C.L., and Wileman, T. (2011) Virus factories, double membrane vesicles and viroplasm generated in animal cells. *Curr Opin Virol* **1**: 381–387.
- Niehl, A., and Heinlein, M. (2011) Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. *Protoplasma* **248**: 75–99.
- Novoa, R.R., Calderita, G., Arranz, R., Fontana, J., Granzow, H., and Risco, C. (2005) Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol Cell* **97**: 147–172.
- Pathak, K.B., Sasvari, Z., and Nagy, P.D. (2008) The host Pex 19p plays a role in peroxisomal localization of tombusvirus replication proteins. *Virology* **379**: 294–305.
- Peng, L., Ryazantsev, S., Sun, R., and Zhou, H. (2010) Three-dimensional visualization of gammaherpesvirus life cycle in host cells by electron tomography. *Structure* **18**: 47–58.
- Pierini, R., Cottam, E., Roberts, R., and Wileman, T. (2009) Modulation of membrane traffic between endoplasmic reticulum, ERGIC and Golgi to generate compartments for the replication of bacteria and viruses. *Semin Cell Dev Biol* **20**: 828–833.
- Pogany, J., Stork, J., Ki, Z., and Nagy, P.D. (2008) *In vitro* assembly of the *Tomato bushy stunt virus* replicase requires the host Heat shock protein 70. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 19956–19961.
- Prod'homme, D., Le Panse, S., Grugeon, G., and Jupin, I. (2001) Detection and subcellular localization of the Turnip Yellow Mosaic Virus 66K replication protein in infected cells. *Virology* **281**: 88–101.
- Qin, W., Luo, H., Nomura, T., Hayashi, N., Yamashita, T., and Murakami, S. (2002) Oligomeric interaction of hepatitis C virus NS5B is critical for catalytic activity of RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* **277**: 2132–2137.
- Radtke, K., Döhner, K., and Sodeik, B. (2006) Viral interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker's guide to the cell. *Cell Microbiol* **8**: 387–400.
- Raoult, D., and Forterre, P. (2008) Redefining viruses: lessons from Mimivirus. *Nat Rev Microbiol* **6**: 315–319.
- Reiss, S., Rebhan, I., Backes, P., Romero-Brey, I., Erfle, H., Matula, P., et al. (2011) Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe* **9**: 32–45.
- Risco, C., Rodríguez, J.R., López-Iglesias, C., Carrascosa, J.L., Esteban, M., and Rodríguez, D. (2002) Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment membranes and vimentin filaments participate in vaccinia virus assembly. *J Virol* **76**: 1839–1855.
- Risco, C., Sanmartín-Conesa, E., Tzeng, W., Frey, T.K., Seybold, V., and de Groot, R.J. (2012) Specific, sensitive, high-resolution detection of protein molecules in eukaryotic cells using metal-tagging transmission electron microscopy. *Structure* **20**: 759–766.
- Rojas, G., Chamorro, M., Salas, M.L., Viñuela, E., Cuezva, J.M., and Salas, J. (1998) Migration of mitochondria to viral assembly sites in African swine fever virus-infected cells. *J Virol* **72**: 7583–7588.
- Schmelz, M., Sodeik, B., Ericsson, M., Wolffe, E.J., Shida, H., Hiller, G., and Griffiths, G. (1994) Assembly of vaccinia virus: the second wrapping cisterna is derived from the trans-Golgi network. *J Virol* **68**: 130–147.
- Schoelz, J.E., Harries, P.A., and Nelson, R.S. (2011) Intracellular transport of plant viruses: finding the door out of the cell. *Mol Plant* **4**: 813–831.
- Schwartz, M., Chen, J., Janda, M., Sullivan, M., den Boon, J., and Ahlquist, P. (2002) A positive-strand RNA virus replication complex parallels form and function of retrovirus capsids. *Mol Cell* **9**: 505–514.
- Spagnolo, J.F., Rossignol, E., Bullitt, E., and Kirkegaard, K. (2010) Enzymatic and nonenzymatic functions of viral RNA-dependent RNA polymerases within oligomeric arrays. *RNA* **16**: 382–393.
- Spuul, P., Balistreri, G., Kääriäinen, L., and Ahola, T. (2010) Phosphatidylinositol 3-kinase-, actin-, and microtubule-dependent transport of Semliki Forest Virus replication complexes from the plasma membrane to modified lysosomes. *J Virol* **84**: 7543–7557.
- Studer, D., Humbel, B.M., and Chiquet, M. (2008) Electron microscopy of high-pressure frozen samples: bridging the gap between cellular ultrastructure and atomic resolution. *Histochem Cell Biol* **130**: 877–889.
- Tolonen, N., Doglio, L., Schleich, S., and Krijnse-Locker, J. (2001) Vaccinia virus DNA replication occurs in ER-enclosed cytoplasmic mini-nuclei. *Mol Biol Cell* **12**: 2031–2046.
- Van Weering, J.R.T., Brown, E., Sharp, T.H., Mantell, J., Cullen, P.J., and Verkade, P. (2010) Intracellular membrane traffic at high resolution. *Methods Cell Biol* **96**: 619–648.
- Walter, C.T., and Barr, J.N. (2011) Recent advances in the molecular and cellular biology of bunyaviruses. *J Gen Virol* **92**: 2467–2484.
- Watashi, K., Ishii, N., Hijikata, M., Inoue, D., Murata, T., Miyazawa, Y., and Shimotohno, K. (2005) Cyclophilin B is a

- functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell* **19**: 111–122.
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C.K.E., Walther, P., *et al.* (2009) Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* **6**: 81–90.
- Wileman, T. (2006) Aggresomes and autophagy generate sites for virus replication. *Science* **312**: 875–878.
- Xiao, C.A., Chipman, P.R., Battisti, A.J., Bowman, V.D., Renesto, P., Raoult, D., and Rossmann, M.G. (2005) Cryo-electron microscopy of the giant Mimivirus. *J Mol Biol* **353**: 493–496.
- Zauberman, N., Mutsafi, Y., Ben Halevy, D., Shimoni, E., Klein, E., Sun, S., and Minsky, A. (2008) Distinct DNA exit and packaging portals in the virus *Acanthamoeba* polyphaga mimivirus. *PLoS Biol* **6**: e114.
- Zhao, H., Lindqvist, B., Garoff, H., von Bonsdorff, C.H., and Liljeström, P. (1994) A tyrosine-based motif in the cytoplasmic domain of the alphavirus envelope protein is essential for budding. *EMBO J* **13**: 4204–4211.

Metadata of the chapter that will be visualized online

Series Title		
Chapter Title	Virus Morphogenesis in the Cell: Methods and Observations	
Chapter SubTitle		
Copyright Year	2013	
Copyright Holder	Springer Science+Business Media Dordrecht	
Corresponding Author	Family Name	Risco
	Particle	
	Given Name	Cristina
	Suffix	
	Division	Cell Structure Laboratory, Department of Macromolecular Structure
	Organization	Centro Nacional de Biotecnología (CSIC)
	Address	Campus de Cantoblanco, c/Darwin 3, 28049, Madrid, Spain
	Email	crisco@cnb.csic.es
Author	Family Name	Castro
	Particle	de
	Given Name	Isabel Fernández
	Suffix	
	Division	Cell Structure Laboratory, Department of Macromolecular Structure
	Organization	Centro Nacional de Biotecnología (CSIC)
	Address	Campus de Cantoblanco, c/Darwin 3, 28049, Madrid, Spain
	Email	
Abstract	<p>Viruses carry out many of their activities inside cells, where they synthesise proteins that are not incorporated into viral particles. Some of these proteins trigger signals to kidnap cell organelles and factors which will form a new macro-structure, the virus factory, that acts as a physical scaffold for viral replication and assembly. We are only beginning to envisage the extraordinary complexity of these interactions, whose characterisation is a clear experimental challenge for which we now have powerful tools. Conventional study of infection kinetics using virology, biochemistry and cell biology methods can be followed by genome-scale screening and global proteomics. These are important new technologies with which we can identify the cell factors used by viruses at different stages in their life cycle. Light microscopy, electron microscopy and electron tomography, together with labelling methods for molecular mapping in situ, show immature viral intermediates, mature virions and recruited cell elements in their natural environment. This chapter describes how these methods are being used to understand the cell biology of viral morphogenesis and suggests what they might achieve in the near future.</p>	
Keywords (separated by '-')	<p>Virus factory - Virus assembly - Virus morphogenesis - Genomics - Proteomics - Light microscopy - Electron microscopy - Tomography - 3D electron microscopy - Super-resolution microscopy - Correlative microscopy - Molecular mapping - Immunofluorescence - Immuno gold - Immuno electron microscopy - Clonable tags</p>	

Chapter 14

Virus Morphogenesis in the Cell: Methods and Observations

1

2

3

Cristina Risco and Isabel Fernández de Castro

4

Abstract Viruses carry out many of their activities inside cells, where they synthesise proteins that are not incorporated into viral particles. Some of these proteins trigger signals to kidnap cell organelles and factors which will form a new macro-structure, the virus factory, that acts as a physical scaffold for viral replication and assembly. We are only beginning to envisage the extraordinary complexity of these interactions, whose characterisation is a clear experimental challenge for which we now have powerful tools. Conventional study of infection kinetics using virology, biochemistry and cell biology methods can be followed by genome-scale screening and global proteomics. These are important new technologies with which we can identify the cell factors used by viruses at different stages in their life cycle. Light microscopy, electron microscopy and electron tomography, together with labelling methods for molecular mapping in situ, show immature viral intermediates, mature virions and recruited cell elements in their natural environment. This chapter describes how these methods are being used to understand the cell biology of viral morphogenesis and suggests what they might achieve in the near future.

Keywords Virus factory • Virus assembly • Virus morphogenesis • Genomics • Proteomics • Light microscopy • Electron microscopy • Tomography • 3D electron microscopy • Super-resolution microscopy • Correlative microscopy • Molecular mapping • Immunofluorescence • Immuno gold • Immuno electron microscopy • Clonable tags

C. Risco (✉) • I.F. de Castro
 Cell Structure Laboratory, Department of Macromolecular Structure, Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), Campus de Cantoblanco, c/Darwin 3, 28049 Madrid, Spain
 e-mail: crisco@cnb.csic.es

25 Abbreviations

26	2D	Two-dimensional
27	3D	Three-dimensional
28	ASFV	African swine fever virus
29	CLEM	Correlative light and electron microscopy
30	DNA	Deoxyribonucleic acid
31	ESCRT	Endosomal sorting complex required for transport
32	ET	Electron tomography
33	GFP	Green fluorescent protein
34	HCV	Hepatitis C virus
35	HIV	Human immunodeficiency virus
36	IEM	Immunoelectron microscopy
37	IF	Immunofluorescence
38	LM	Light microscopy
39	RC	Replication complex
40	RNA	Ribonucleic acid
41	SEM	Scanning electron microscopy
42	TEM	Transmission electron microscopy
43	VV	Vaccinia virus
44	Y2H	Yeast two-hybrid

45 14.1 Introduction: Cell Biology of Virus Morphogenesis 46 and the Concept of the Virus Factory

47 The idea of viruses as inert molecular entities has progressively been transformed
48 since scientists began to discover the myriad of interactions that occur during the
49 intracellular phase of virus life. Restricted by their own limited genetic repertoire,
50 viruses need to use a number of cell factors for genome replication and morpho-
51 genesis. Identification of these factors is essential for understanding the virus
52 morphogenetic processes that often take place in intracellular structures known as
53 viral inclusions, virosomes or viral factories. Viruses are generally thought to build
54 these structures to recruit and concentrate viral and cell factors needed for replica-
55 tion and assembly; they are able to modify a variety of cell organelles and to create
56 new inter-organelle contacts (Fig. 14.1). In the mammalian cell, virus assembly can
57 start inside the nucleus, in association with components of the secretory pathway
58 (Golgi, endoplasmic reticulum or ER), at different points in the endocytic pathway
59 (endosomes, multivesicular bodies or MVB) or at the plasma membrane.
60 Mitochondria and cytoskeletal elements are present in the factories built by many
61 different viruses.

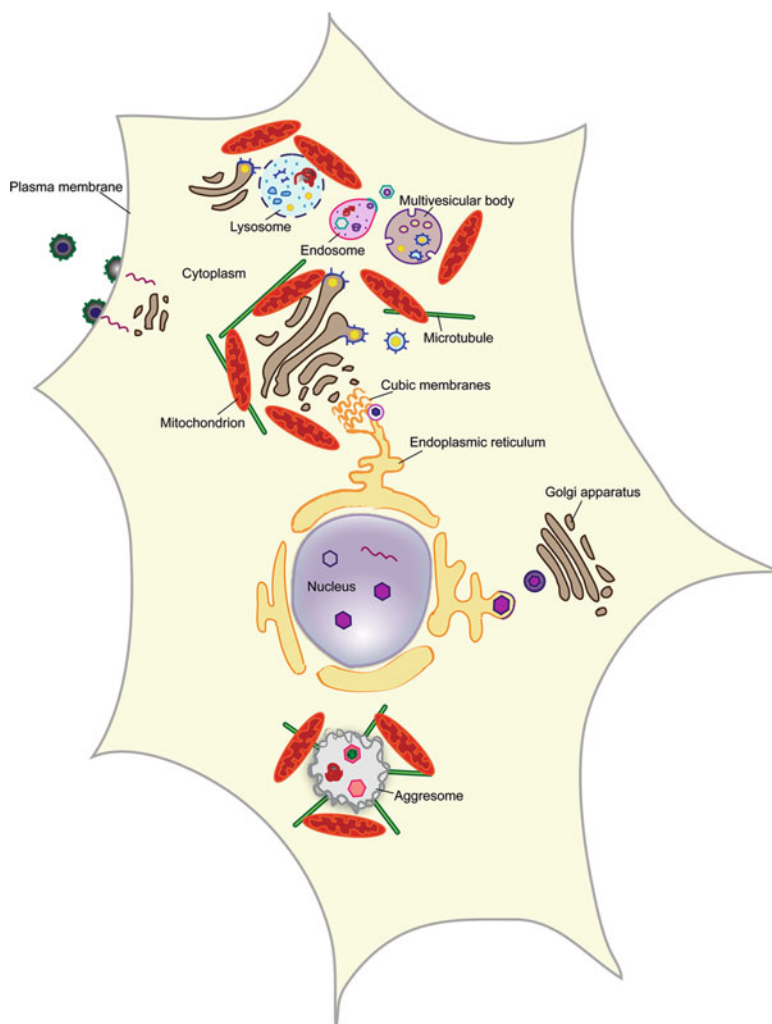


Fig. 14.1 Cell organelles used for viral morphogenesis. The cell nucleus is used by herpes- and papillomaviruses; corona-, bunya- and flaviviruses use components of the secretory pathway such as the endoplasmic reticulum and Golgi; togaviruses and the human cytomegalovirus use components of the endo-lysosomal pathway such as endosomes, multivesicular bodies and lysosomes; the African swine fever virus (ASFV) and poxviruses assemble in aggresome-like structures; assembly sites of retroviruses at the plasma membrane might be connected with a cytoplasmic factory. Viruses modify endomembranes, recruit mitochondria and cytoskeleton, and create new inter-organelle contacts

Virus factories are usually rather large, several microns in diameter, and are very dynamic, as their structure changes over time in accordance with virus needs [1]. This strategy appears to allow viruses to generate progeny with maximum efficiency in the use of cell resources. It is also thought that viruses can use these

scaffolds to protect themselves from cellular antiviral defences [2]. Viral factories were first described for large DNA viruses such as the African swine fever virus (ASFV) and the poxviruses; we now know that many DNA and RNA viruses build factories in the cytosol, in the nucleus, or both. Due to our limited knowledge of cell nucleus organisation, characterisation of nuclear viral factories is only beginning. In contrast, viral factories assembled in the cytosol are being studied extensively and there are many reports on their architecture and activities. Inside these cytosolic factories, morphogenesis of new viruses begins with the transport of replicated genomes from the structures that harbour the replication complexes (RC) to the assembly sites. Depending on the virus, a number of maturation steps will follow (see Chap. 13 for details) before new viral particles are ready for delivery and propagation.

This chapter will describe fundamental tools for diving inside the infected cell and understanding virus assembly. We also describe relevant examples of virus-cell interactions during virus morphogenesis that are being discovered using in situ techniques.

14.2 Methods for the Study of Virus-Cell Interactions During Morphogenesis

By identifying essential cell factors, studies based on recent advances in molecular biology, genomics and proteomics are broadening our knowledge of viral morphogenesis. To confirm and understand the role of potentially interesting genes in viral assembly, the information acquired must be subsequently analysed at a more complex level in infected cells. Exploring existing databases on cell pathways which combine information on genetic, metabolic and signal networks based on the literature can be a first step in further work that on many occasions will also include imaging with a variety of microscopy technologies.

14.2.1 Identification of Essential Cell Factors

Characterisation of infection kinetics is the first step in the study of viral morphogenesis. Conventional virology, biochemistry and cell biology methods allow us to determine optimal experimental conditions, including times post-infection (p.i.) and the most appropriate cell types. Key factors can be identified using two main groups of methods, (1) those that analyze gene expression patterns, and (2) those that study protein-protein interactions.

A number of new techniques can be applied to study interactions between viruses and cells on a genomic scale [3]. Microarrays are being used to identify mRNA transcription patterns in different phases of the virus life cycle. DNA gene

chips detect differences in gene expression between uninfected and virus-infected cells and at different infection stages. Gene data bases are then useful for associating the genes identified with specific cell pathways [4, 5]. High-throughput screening based on RNA interference (RNAi) is another category of methods that analyse gene expression patterns. RNAi is an RNA-dependent gene silencing process within living cells that is often exploited to study the function of genes. This emerging technology is used to study how viruses interact with their hosts at the molecular level. Analysis at various times post-infection has identified a number of cell factors potentially involved in viral morphogenesis, for example for dengue [6], influenza [7] and retroviruses [8]. RNAi may be used for large-scale screens that systematically shut down each gene in the cell. Studies using this approach have shown a requirement for cell factors such as the ESCRT machinery for assembly of the human immunodeficiency virus, HIV [9].

The group of techniques termed proteomics includes powerful methods to study protein-protein interactions. The yeast two-hybrid (Y2H) assay system remains one of the most amenable techniques and is widely used to search for virus-host interactions. Y2H works by expressing two candidate proteins in the yeast cell. Bait and prey proteins are fused either to a promoter-specific DNA-binding domain or to a transcription activation domain. Interaction between the two proteins in the yeast nucleus brings both domains together so that they can initiate expression of a reporter gene [10]. Individual bait proteins can be screened for interaction with a library of prey proteins. Genome-scale Y2H studies were used to identify 314 virus-host interactions for HCV [11] 109 interactions for vaccinia virus [12] and nine for HIV-1 [13]. Similar techniques, such as the yeast three-hybrid system, can be used to study interactions between nucleic acids and proteins [14, 15]. This group of methods also includes pull-down and immunoprecipitation assays, and tandem affinity purification (TAP) tagging approaches, as well as protein identification by quantitative and semi-quantitative mass spectrometry. Whereas Y2H usually detects transient interactions, affinity-tag purification mass spectrometry shows stable, stoichiometric complexes. Since cell proteins often incorporate into viral particles, these techniques can be applied to the study of protein-protein interactions in the infected cell and in purified viral assembly intermediates [16]. This is the case of clathrin, for example, which was found in retrovirus particles; clathrin was only recently identified as one of the cell factors that facilitate accurate morphogenesis of several retroviruses [17]. Y2H technology also detected cell proteins that interfere with virus assembly and viral proteins that block them. This is the case of tetherin, first detected by proteomics and mass spectrometric protein identification as a cell factor that restricts retrovirus assembly [18], and later confirmed as a restriction factor for a wide variety of enveloped viruses [19]. Viruses have several anti-tetherin proteins to counteract the effect of this factor [20]. The current challenge of high-throughput technologies is to develop more efficient informatics tools to accurately analyse the vast amount of information they can provide [21].

The next step in the characterisation of in-cell virus assembly pathways would be to study the specific roles of the factors identified in their natural environment; to

do this, we must of course return to the infected cell. Functions can be tested by protein depletion or overexpression, by mutagenesis or by protein targeting with tags. To visualise key factors in infected cells, there are a variety of classical and novel microscopy techniques that will be described in the following sections.

14.2.2 Studying Viral Morphogenesis in Situ with Light and Electron Microscopy

Microscopy has played an essential role in our understanding of cell architecture and viral assembly (see [Chap. 3](#)). Light microscopy (LM) and transmission electron microscopy (TEM) provide different types of information about viral infection, ranging from general events that involve the whole cell to the detailed imaging of nascent and maturing viral particles in specific cell compartments (Fig. 14.2). With resolutions in the 100–500 nm range, LM shows organelle recruitment and modification in the assembly compartment and, in the case of the largest viruses, individual new viral particles as well [23]. In immunofluorescence assays using antibodies to viral proteins and cell compartments, we can see where viral structural and scaffolding proteins ([Chap. 11](#)) concentrate to create the assembly sites. Light microscopy shows, for example, that the same virus can build distinct factories in different cell types, depending on specific characteristics of the cell (Fig. 14.2a, b). Functional viruses that express proteins fused with clonable fluorescent tags such as the green fluorescent protein (GFP) (see [Sect. 14.3](#) for details) can be followed in live cells [24]. Video microscopy facilitates dynamic characterisation of the biogenesis of the factory and virus assembly in real time. Time course experiments with antibody-labelled permeabilised cells or video microscopy studies with GFP fusions in living cells are essential for selecting specific conditions, such as the best times p.i., for more detailed, higher resolution study by TEM.

Electron microscopy generally uses ultra-thin sections of cells previously embedded in plastic resins after conventional fixation and dehydration; alternatively, cells are processed at low temperature after or upon fixation for optimal preservation of ultrastructure (see [Chap. 3](#) for sample preparation details), or subjected to cryofixation procedures such as high-pressure freezing prior to freeze substitution and embedding, or freeze-fracture analyses. With resolutions in the range of a few nanometers, cell TEM can show changes in shape and size of virus assembly intermediates in specific intracellular compartments [25, 26] (Fig. 14.2c, d). TEM of infected cells shows that mitochondria, endomembranes and cytoskeleton often participate in organising the structure that supports viral assembly. To complete maturation and become infectious, immature viral particles must often travel within the factory to find specific cell factors. At late times post-infection, once virus progeny have been produced and must find their way out of the cell, the factory can be dismantled [1].

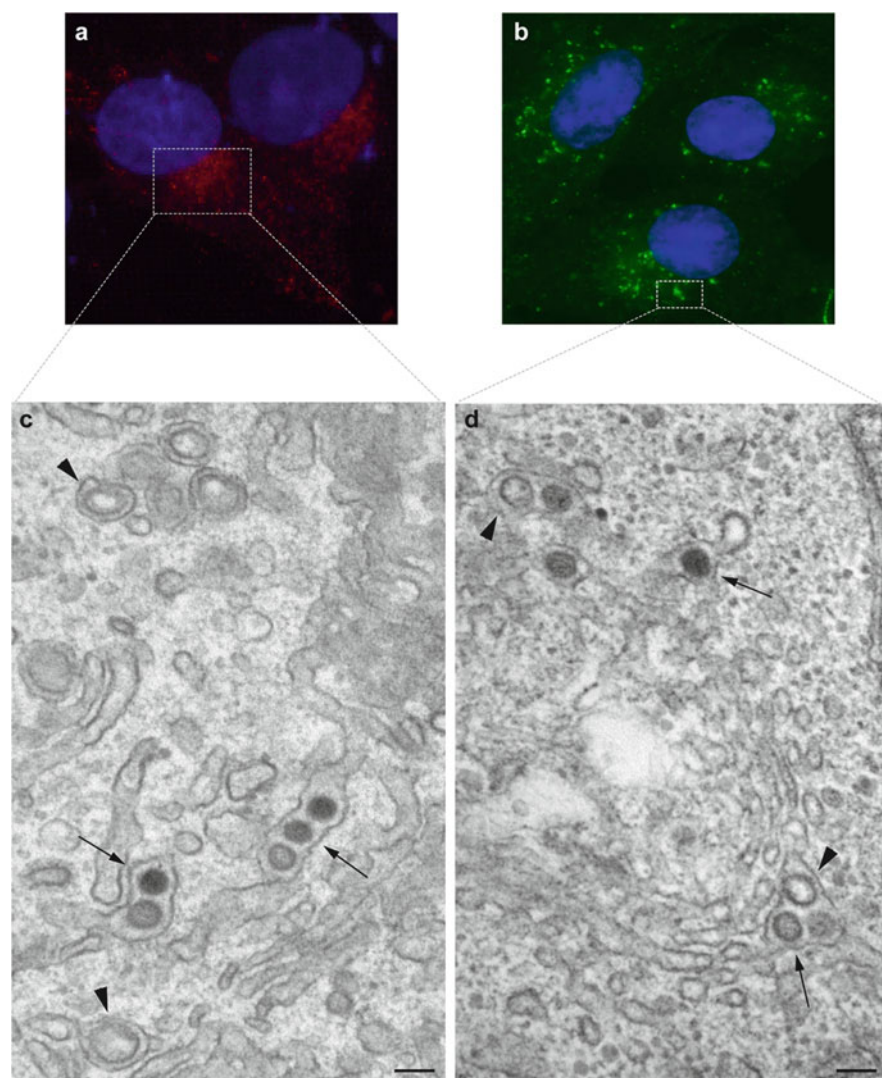


Fig. 14.2 Studying virus assembly by light and electron microscopy. (a, b) Immunofluorescence microscopy of BHK-21 (a) and Vero cells (b) infected with a bunyavirus at 10 h.p.i. (h.p.i.). Cells were labelled with an antibody specific for one of the viral structural proteins that concentrates at the assembly sites. A single large perinuclear factory is formed in BHK-21 cells, whereas many mini-factories are seen in Vero cells. (c, d) TEM of BHK-21 (c) and Vero cells (d) at 10 h.p.i. In both cases, similar spherules, the structures that harbour the RC (arrowheads) [22] and viral intermediates (arrows) are distinguished in Golgi membranes. Scale bars, 100 nm

TEM of cells in two dimensions provides a first glimpse of the viral morphoge- 186
netic pathways in situ. The size of cells (several microns in diameter) and the 187
thickness of ultra-thin sections (50–100 nm) nonetheless constitute a major 188

189 limitation, because we are actually studying single planes of much larger structures.
190 In these conditions, many elements and contacts can be missed. Three-dimensional
191 TEM avoids this limitation; the variety of methods available is described in the
192 following sections.

193 **14.2.3 Visualising Virus Assembly in Three Dimensions I: 3D** 194 **Reconstructions of Serial Sections, TEM and SEM**

195 In conventional TEM, electrons must traverse the sample to generate a projection
196 image. Samples must therefore be thin, around 50–100 nm, thinner than many
197 viruses. Given that eukaryotic cells are several microns in diameter, the ultra-thin
198 sections are single planes of much larger structures. For conventional TEM, cells
199 are fixed on culture plates and collected by low speed centrifugation, followed by
200 sectioning of the pellet. In these conditions, cells preserve their morphology but
201 present a variety of orientations (Fig. 14.3a); analysis is therefore restricted to
202 random, unique sections of cells, and scarce or non-randomly distributed elements
203 can be missed completely. Oriented serial sections solve this problem (Fig. 14.3b).
204 By collecting all serial sections from each cell, all intracellular elements can be
205 detected and studied. This strategy guarantees a complete analysis without missing
206 any intracellular event of interest; immunofluorescence can assist by localising where
207 viruses are assembled within a cell and thus, where cells should be sectioned for TEM
208 [22]. The study of oriented serial sections is very informative and has revealed
209 unreported contacts between cell organelles, RC and assembly sites, as well as the
210 relationships of different viral intermediates with specific cell elements (Fig. 14.3c).
211 After image processing and segmentation to assign identities to all individual
212 structures in the images, serial sections can be aligned and combined in 3D
213 reconstructions [27]. With resolution values of ~5 nm in the X and Y axes, these 3D
214 reconstructions can show viruses in factories with considerable detail (Fig. 14.3d, e).
215 Resolution in the Z axis is limited, however, with values of ~50–100 nm due to
216 imperfections in the alignment process.

217 Scanning electron microscopy (SEM) can also be used to visualise virus mor-
218 phogenesis. These microscopes use a focused beam of high-energy electrons to
219 generate a variety of signals at the surface of solid specimens. Samples are covered
220 by a thin layer of metal and scanned with a primary source of electrons; secondary
221 electrons are then released from the sample surface and collected by a detector. The
222 signals derived from electron-sample interactions furnish information about the
223 sample, including external morphology in 3D. Modern scanning electron
224 microscopes can now provide resolutions as precise as 2–5 nm, near that achieved
225 by cellular electron microscopy [28]. SEM images can show morphological
226 changes in large virus particles during maturation in situ; this is the case, for
227 example, of the giant mimivirus (Fig. 14.4a, b). In lysed cells and isolated virus
228 factories visualised by SEM, immature viruses are clearly distinguished at short

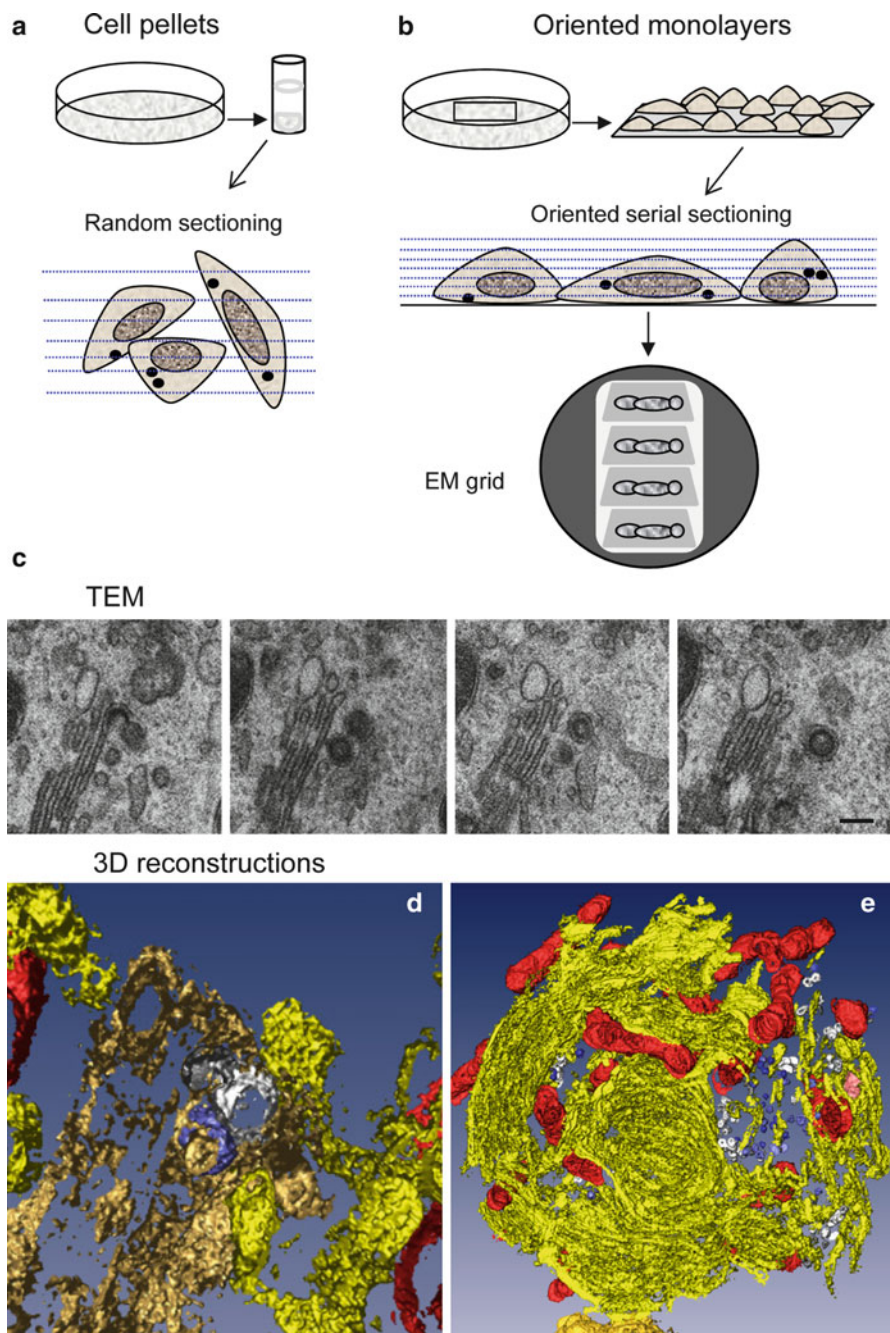


Fig. 14.3 Serial sections, TEM and 3D reconstructions. (a, b) Summary of the principles and differences between conventional ultra-thin sectioning and oriented serial sectioning. (c) Serial sections in TEM and (d) 3D reconstruction showing the interaction between a spherule, the structure that harbours the RC (white) and a viral particle (blue) in Golgi membranes (beige). Mitochondria are segmented in red and rough endoplasmic reticulum (RER) in yellow. (e) 3D reconstruction of a viral factory from a different cell. In this case, 15 serial sections were used. The Golgi complex has been removed to improve visualisation of RC and viral particles. Scale bar, 100 nm

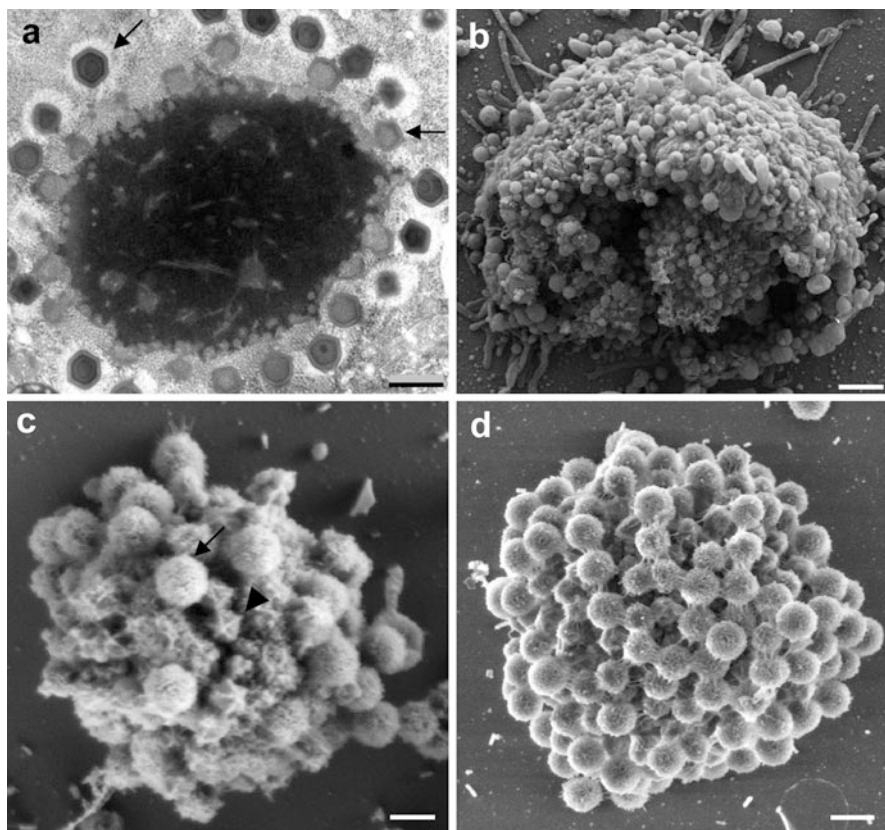


Fig. 14.4 Mimivirus factory in 2D and 3D by TEM and SEM. **a)** 2D views of a virus factory as visualised by TEM, showing virus particles (*arrows*) at various assembly stages. **(b)** 3D views of a viral factory within an amoeba cell lysed at 8 h.p.i. and visualised by SEM. **(c)** SEM of a factory isolated at 8 h.p.i. Viral particles are seen at various assembly stages. The *arrow* indicates a mature virus particle and the *arrowhead*, an immature particle. **(d)** SEM of a virus factory isolated at 10 h. p.i. Only mature viruses can be detected. Scale bars, 500 nm in **(a)** and **(d)**; 2 μ m in **(b)**; 300 nm in **(c)** (Reproduced with permission from [29])

229 times p.i. (Fig. 14.4c), whereas mature virions accumulate in the factory at longer
230 times p.i. (Fig. 14.4d) [29].

231 TEM in combination with freeze-fracture and metal shadowing allows higher
232 resolution 3D views of viruses inside intact cells. Frozen cells are fractured
233 mechanically and covered with a thin layer of platinum and carbon in a vacuum
234 chamber, the metal replicas are then washed to eliminate organic materials and
235 mounted on EM grids. The main limitation of this approach derives from the
236 unpredictable patterns of the fracture planes and the difficulty in interpreting
237 the images. It can nevertheless be useful when studying the morphogenesis of
238 large enveloped viruses (Chap. 11) and their interactions with cell endomembranes
239 during assembly and maturation [30].

14.2.4 Visualizing Virus Assembly in Three Dimensions II: Electron Tomography 240 241

Electron tomography (ET) of infected cells shows virus assembly in 3D with resolutions of ~3-5 nm in all three axes, X, Y, and Z (see Chap. 3). Higher resolutions of ~1 nm have been reported, as was the case of the budding HIV viral particles visualised by cryo-electron microscopy on the surface of intact human cells [31]. Both normal and aberrant budding events were visualised on the cell surface, suggesting that cellular and/or viral factors control the quality of virus assembly and maturation. A limitation of cellular tomography is that the maximum thickness of the sample must be <0.5 µm, whereas virus factories are larger; however, conventional TEM methods like those described above can help to select specific elements within cells for more detailed ET structural analysis. Thanks to ET, elusive structures have been visualised for the first time, such as the transfer of viral genomes from RC to assembly sites in dengue virus-infected cells [32] (Fig. 14.5a, b). The morphogenesis of poxviruses is another good example; vaccinia virus (VV) assembly and architecture were the subject of numerous studies, but the organisation and biogenesis of immature and mature VV particles were not understood until the first ET studies were carried out [33, 34]. These analyses showed unprecedented remodelling of cell endomembranes during VV particle assembly (Fig. 14.5c, d). Tomograms are analysed in detail in computational slices of 1–2 nm extracted from the original volumes (Fig. 14.5a). As with serial sections in conventional TEM, the relevant information is contained in these single planes, whereas 3D representations are models used to summarise the most relevant features in the tomograms (see Chap. 3 for details).

In summary, two main groups of methods are available for 3D studies of viral assembly. 3D reconstructions of serial sections by TEM or analysis of surface morphology by SEM will show the general organisation of the virus factory, the inter-organelle contacts, and changes in the cell compartments where viruses are formed. In contrast, electron tomography is more appropriate for studying individual viral particles and to obtain fine details of their maturation in situ.

14.3 Molecular Mapping of Viral Morphogenesis 270

The discipline known as histochemistry includes a great variety of techniques to visualise molecules in biological samples [35]. There are several histochemical methods to localise nucleic acids, lipids, sugars, and other molecules, some of which have been used to label viruses in cells. Nonetheless, protein-labelling techniques are by far the most developed; because of their importance in the study of virus morphogenesis, in this section we will focus on methods that detect proteins in light and electron microscopy.

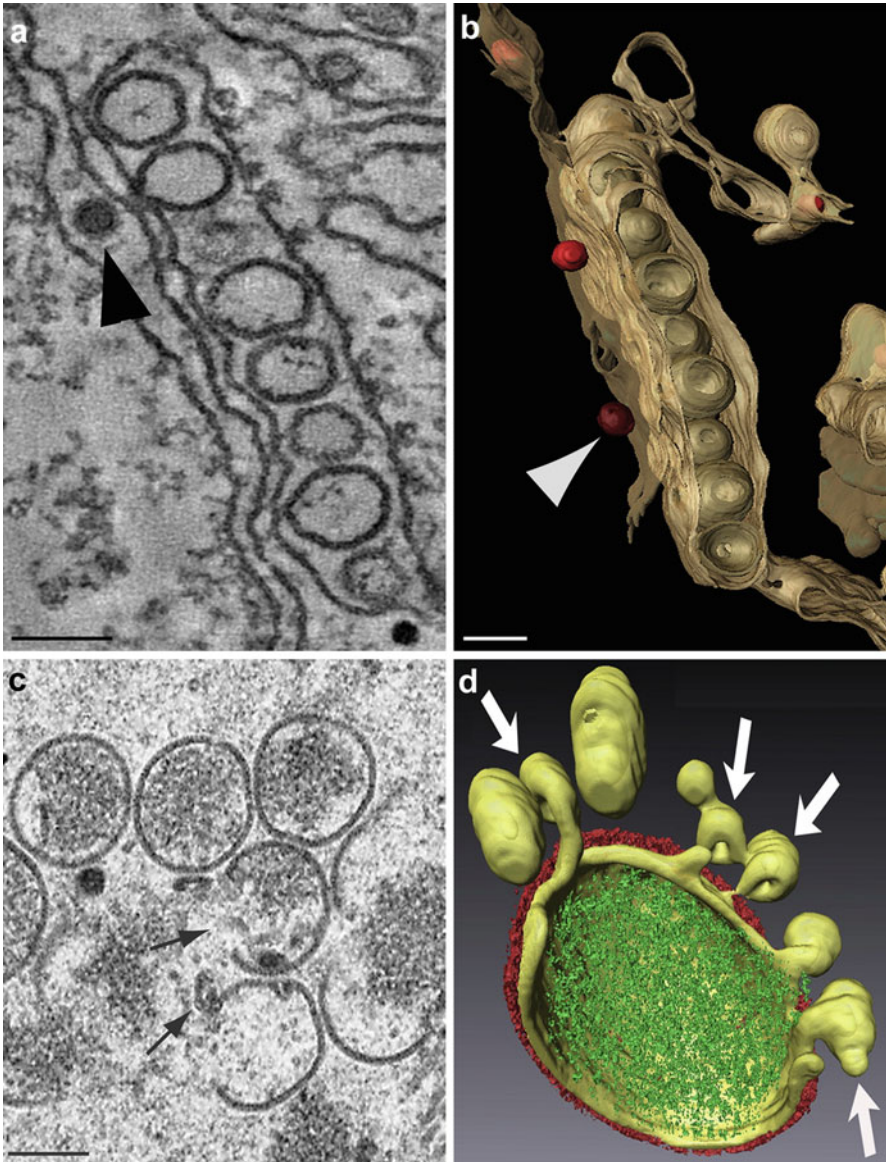


Fig. 14.5 3D electron tomography of virus assembly. (a) Computational slice and (b) 3D reconstruction of the dengue virus factory as visualised by ET. Nascent viral particles (*arrowheads*) face the sphereules that harbour the RC. (c, d) 2D TEM and 3D ET, respectively, of immature VV particles in the process of assembly from cell membranes (*arrows*). ET shows how the viral envelope is connected to a collection of open membrane structures and how these membranes contribute to envelope formation. Scale bars, 100 nm in (a) and (b); 250 nm in (c) (Reproduced with permission from [32] (a) and (b), and [33] (d))

14.3.1 *Antibodies, Immunofluorescence and Immunoelectron Microscopy* 278 279

Previous sections of this chapter have shown how to identify key factors for virus morphogenesis and how to visualise virus assembly in cells in two and three dimensions. To link the information from both methods and to fully understand viral morphogenesis, we also need methods for molecular mapping in situ. Molecules of interest, which are viral and cellular factors, can be localised in cells with specific antibodies in immunolabelling assays or with clonable tags (Fig. 14.6).

Antibodies detect proteins with high specificity and variable sensitivity. Primary antibodies generated against proteins of interest are detected with secondary antibodies conjugated to a fluorescent probe for LM visualisation, or to an electron-dense colloidal gold particle, which is easy to detect by EM in immunogold assays (Fig. 14.6a). Antibodies have been and are still fundamental tools in electron microscopy [36, 37]. When immunolabelling proteins on cryosections, where cells have not been dehydrated and maintain their proteins in a natural hydrated state, the sensitivity of antibody detection is usually higher than that obtained when labelling sections of dehydrated, resin-embedded cells. Since the introduction of cryosectioning, the method has been improved and perfected [38, 39]. This approach allows colocalisation of nascent and maturing viral particles in specific cell compartments and the proteins being incorporated into assembling virus particles (Fig. 14.6b). Although antibodies are usually very specific, information derived from these experiments is later confirmed in biochemical assays.

Due to their large size, antibodies that recognise internal structures must be used on cell sections. Alternatively, cells can be permeabilised to label intracellular compartments (Fig. 14.6c), although this is incompatible with preservation of fine ultrastructure. Certain permeabilisation protocols use the bacterial exotoxin streptolysin O (SLO) to open pores in the plasma membrane while leaving intracellular membranes untouched. This was used in pre-embedding immunogold assays to follow viral and cell proteins during VV assembly from intracellular membranes [40].

An important limitation of antibodies is their variable sensitivity due to epitope loss during sample preparation and to macromolecular interactions inside cells that often mask the protein epitopes in vivo. This is particularly problematic when the proteins of interest are part of densely packed macromolecular complexes, such as those involved in virus assembly. The use of clonable tags can overcome these limitations.

14.3.2 *Clonable Tags* 314

Jellyfish green fluorescent protein (GFP), its mutants and homologues have caused a true revolution in cell biology. If proteins fused to a fluorescent tag maintain their

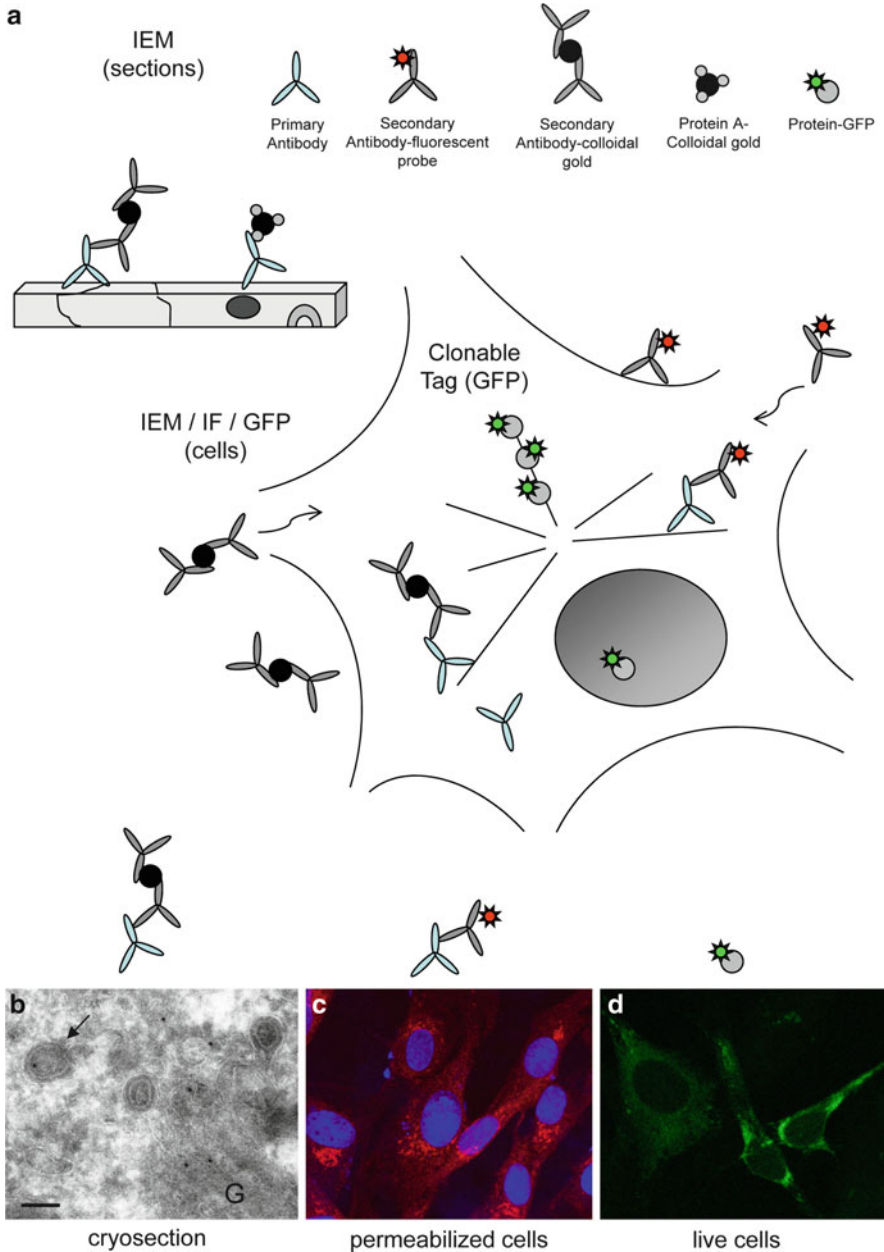


Fig. 14.6 Molecular mapping of virus assembly with antibodies and clonable tags. (a) Schemes showing the principles of labelling on thin sections, whole permeabilised cells and intact cells. (b) Immunogold detection on a cryosection from a bunyavirus-infected cell. Cells were labelled with a primary antibody specific for a viral scaffolding protein, followed by secondary antibodies conjugated to 10 nm colloidal gold particles. The protein is detected in Golgi membranes (G) and

normal functions, their movements and interactions with intracellular structures can be tracked in living cells (Fig. 14.6d). In conjunction with the new generation of LM methods, we can even follow the assembly of individual virus particles at real time [41]. GFP is a relatively large molecule (27 kDa) and, since viral proteins have very strict structural requirements, fusion to GFP can produce loss of function. If this is the case, probes smaller than GFP could be a viable option. The group of smaller probes includes the fluorescent flavoprotein known as miniSOG, which is less than half the size of GFP [42], or the smaller tetra-cysteine motifs, which are visualised after incubation with fluorescent biarsenical molecules such as ReAsH or FAsH [43].

The use of clonable tags in TEM and ET would be a considerable advance for high resolution studies of virus assembly. The first clonable tags for EM validated in cells have yet to be used in virus morphogenesis studies, but show good prospects and will be listed in Sect. 14.5.3.

14.4 The Search for Signalling Pathways

The initiation of virus morphogenesis usually requires major reorganisation of cell membrane compartments and the cytoskeleton. Many laboratories are applying the methods described in previous sections to understand how viruses take control of cells and recruit all the necessary materials for their morphogenesis. The complexity of the interactions inside infected cells can be extraordinary, as illustrated by the viruses known as virophages that parasitise the factory built by other viruses. Some images of cells co-infected by the giant mimivirus and the virophage “Sputnik” suggest that the small virophage not only uses the materials recruited by the mimivirus for its own replication, but might even hide inside the mimivirus particles to exit the cell [44]. We still do not know how organelles and materials are recruited or how replicated viral genomes are transported from RC to assembly sites. We do know, however, that viruses target their proteins to specific cell compartments, that some viruses use a cellular defence mechanism termed the aggresome response, and that signals related to organelle movement on cytoskeletal tracks could also be involved [1, 2].

Fig. 14.6 (continued) viral particles (arrow). (c) Immunofluorescence detection of the same scaffolding protein in permeabilised cells. (d) Still image from a video recorded in a fluorescence microscope equipped for live cell imaging. Cells were infected with a recombinant virus that expresses the same scaffolding protein fused with GFP. Scale bar, 100 nm

347 **14.4.1 DNA Viruses and Cell Aggresomes**

348 Aggresomes are a defence response of cells to protein misfolding and aggregation.
 349 These inclusions form at the microtubule-organising centre (MTOC), where they
 350 enclose potentially toxic protein aggregates within vimentin cages. The large DNA
 351 viruses of animals such as the African swine fever virus (ASFV), the poxviruses,
 352 and the iridovirus frog virus three build factories that closely resemble cell
 353 aggresomes (Fig. 14.7a) [1, 2, 45, 46]. Virus factories and aggresomes both
 354 assemble at the MTOC, recruit mitochondria and cell chaperones, build a cage
 355 with vimentin filaments, and are maintained by the activity of dynein motors on
 356 microtubules. EM shows membranes, ribosomes, viral intermediates and fully
 357 assembled viruses inside the vimentin cage of the ASFV aggresome-like factory
 358 (Fig. 14.7b). It is suggested that viruses kidnap the aggresome pathway to avoid
 359 being recognised as foreign, or alternatively, to be mistaken for a misfolded protein
 360 by the cell, thus triggering the aggresome response [2].

361 A similar strategy might be used by viruses that replicate and assemble in the cell
 362 nucleus and associate with structures known as POD (potential oncogenic
 363 domains). POD are nuclear aggresomes used by herpes-, papilloma-, adeno- and
 364 parvoviruses. Recent observations suggest that some RNA viruses use aggresomes
 365 to build their factories. Since the common feature of factories built by RNA viruses
 366 is the remodelling and recruitment of cell endomembranes, however, different
 367 signalling pathways must be triggered in this case.

368 **14.4.2 RNA Viruses and Membrane Remodelling**

369 DNA viruses usually build distinct, and even distant factories for genome replication
 370 and morphogenesis. Herpesviruses, for example, must connect the first steps of
 371 assembly inside the nucleus with subsequent incorporation of proteins and membranes
 372 in the cytosol; poxviruses must coordinate replication in cytosolic mini-nuclei with
 373 primary assembly in aggresome-like structures and final wrapping in the Golgi
 374 apparatus [1]. In contrast, RNA viruses often induce the construction of a single
 375 sophisticated membranous web in which replication complexes and assembly sites
 376 are located near each other. Expression of viral replicase complexes is usually
 377 sufficient to trigger membrane remodelling and organelle recruitment [47, 48].

378 Viruses take control of cell endomembranes by interfering with lipid metabo-
 379 lism, protein regulation and transport. The secretory pathway is the most common
 380 target for this virus-induced membrane remodelling, while the endocytic pathway
 381 also participates in some cases (Fig. 14.1). The two pathways are closely related, in
 382 fact, and converge at the trans-Golgi compartment. Described in the literature with
 383 many different names, the membranous tubuloreticular structures (TBS) often
 384 detected in infected cells are indeed cubic membranes that consist of highly curved,
 385 3D-folded lipid bilayers. Alterations in cholesterol metabolism are linked to the

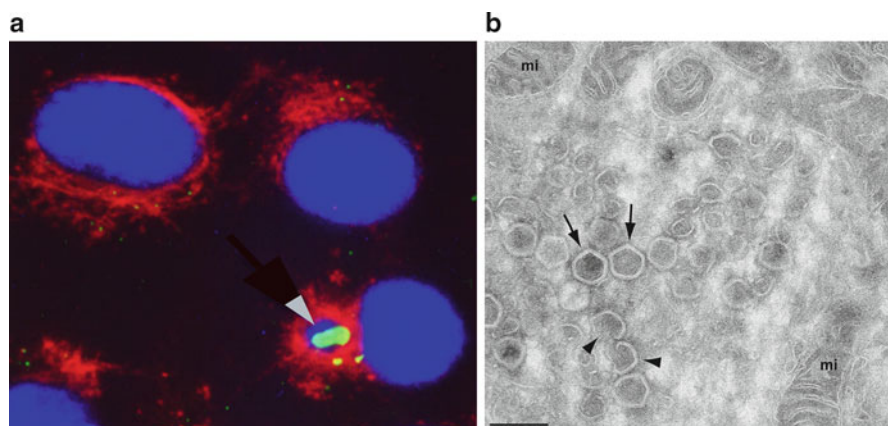


Fig. 14.7 Virus assembly in cell aggresomes. **(a)** The factories of the ASFV resemble cell aggresomes, as shown by immunofluorescence. Viral proteins (*green*) co-localise with DNA (*blue*) inside vimentin cages (*red*). **(b)** TEM of an ASFV factory, showing mitochondria (*mi*), viral intermediates (*arrowheads*) and mature viruses (*arrows*). Scale bar, 250 nm. Images kindly provided by Dr. Germán Andrés (CBMSO-CSIC, Spain)

biogenesis of cubic membranes, used for assembly by some viruses such as the SARS (severe acute respiratory syndrome) coronavirus [49]. Other viruses depend on phosphatidylcholine synthesis, fatty acid synthesis or geranylation. The highly curved nature of cubic membranes, possibly induced by multiple interactions between replicase proteins, might assist virus budding. Virus replication often slows secretion, however, which means that viruses can interfere with membrane trafficking proteins and their regulation by small GTPases [2, 47]. Additional host factors involved in virus-induced membrane remodelling include the SNARE (soluble NSF attachment protein receptor) proteins, which are mediators of vesicle fusion used by the human cytomegalovirus (HCMV), the VAMP-associated proteins (VAP) that bind to SNARE and are used by hepatitis C virus, and the ESCRT (endosomal sorting complex required for transport), which are essential for HIV assembly in the plasma membrane [19, 47, 50].

Inside membranous webs, virus assembly is precisely coordinated with transport of replicated viral genomes from the RC; the specific machinery remains to be identified. Lessons from plant viruses and their movement proteins involved in viral genome transport inside cells and between cells through plasmodesmata can provide some clues for the study of animal viruses [51].

Finally, signalling related to cytoskeleton-mediated organelle movement, particularly in the case of mitochondria, can be essential for factory assembly and virus morphogenesis. Mitochondria attach to membranous webs and are thought to provide energy for viral factory activities. They can have additional roles, as in infected cells it was observed that some mitochondrial proteins abandon the organelle and are integrated into the factories, where they interact with viral proteins [52, 53].

411 **14.5 Perspectives and Conclusions**

412 Some of the following new methodologies have not yet been applied to the study of
413 viral morphogenesis, but their capacity to track macromolecules in cells suggests
414 great potential for the study of virus assembly.

415 **14.5.1 Super-Resolution Fluorescence Microscopy**

416 Limited by the diffraction barrier, conventional light microscopy methods reach
417 resolutions of ~100–500 nm. Many viruses and cell substructures are smaller than
418 this and cannot be solved by LM. In recent years, several laboratories have
419 developed a group of optical microscopy methods, termed super-resolution micros-
420 copy, that have improved spatial resolution by an order of magnitude over the
421 diffraction limit [54]. Future improvements in microscopes, fluorescent probes and
422 labelling chemistry will further refine the resolution of these methods, considerably
423 narrowing the gap between light and electron microscopy. Using a variety of
424 technical strategies, these new technologies have begun to provide insights into
425 cell biology and virology. In particular, real-time imaging methods that track
426 individual virus particles in living cells are being used to study virus assembly,
427 and super-resolution microscopy has already defined interactions with cell factors
428 during HIV-1 budding [55, 56]. In the near future, these microscopies will have an
429 increasing impact in the field of virus morphogenesis.

430 **14.5.2 Correlative Microscopy: From Live Cells to High** 431 **Resolution**

432 Electron microscopy has contributed more than any other method to our under-
433 standing of virus assembly in the cell, although its static nature nonetheless makes it
434 difficult to characterise highly dynamic processes. Correlative light and electron
435 microscopy (CLEM) combines the advantages of live cell imaging with the high
436 resolution of EM. A number of procedures have been reported, and the method of
437 choice depends on the research question [37]. Basically, with CLEM we can select
438 individual live cells with interesting features for a detailed, high-resolution study in
439 TEM and ET. Finding adequate probes for CLEM will be the main technical
440 challenge of these studies.

14.5.3 *Clonable Tags for Electron Microscopy and Tomography* 441 442

Genetically clonable tags for TEM and ET would supply new strategies for the 443
ultrastructural characterisation of virus assembly. To date, two types of approaches 444
have been reported, using photoconversion of fluorescent tags or metal-binding 445
proteins. Diaminobenzidine (DAB) can be photoconverted by production of singlet 446
oxygen from fluorescing proteins to generate dense osmophilic precipitates that are 447
visible in the electron microscope [57]. The resulting signals are diffuse and lack 448
the resolution of particulate probes, although reasonable results have been obtained 449
for proteins concentrated in cell organelles and in electron tomography [37, 42]. 450

Metal-binding proteins were recently validated as clonable tags for EM in 451
bacteria [58, 59] and mammalian cells [60]. These methods allow detection of 452
intracellular proteins at high sensitivity and molecular scale resolution. To track 453
protein molecules in CLEM, proteins can be double-tagged with a metal-binding 454
peptide and a fluorescent probe. This will give us a new way to look inside cells and 455
visualise where and how individual macromolecules come together to build viral 456
particles. 457

14.5.4 *Conclusions* 458

New technologies have recently begun to offer access to analysis of viruses in cells 459
in unprecedented detail. The complexity of the interaction networks established in 460
these contexts is changing our concept of viruses from that of inert molecular 461
organisms to “live” entities able to carry out a wide variety of activities inside cells. 462

The different technologies and their integration for the study of virus-cell 463
interactions are summarised in Fig. 14.8. From the conventional techniques used 464
to characterise infection kinetics to the new developments in proteomics, genomics, 465
bioinformatics and microscopy, research in this field is generating a vast amount of 466
information about how viruses manage to assemble all the machinery needed to 467
build infectious particles from viral macromolecules and cell materials. Relevant 468
examples on what is being learned on the participation of host cell factors in virus 469
assembly have been described in this chapter by focusing on studies with a few 470
representative model systems. Future work must be accompanied by studies of how 471
cells position their proteins and regulate organelle shape, size and movement. By 472
understanding how viruses manipulate these processes, we will not only learn about 473
viruses but also about cell architecture and compartmentalisation of functions. 474

Acknowledgements Our gratitude to Drs German Andrés, Abraham Minsky, Ralf 475
Bartenschlager, Petr Chlanda, Jacomine Krijnse-Locker, Laura Sanz, José Jesús Fernández, Juan 476
Fontana, and Noelia López Montero for providing images, and to Catherine Mark for editorial 477
assistance. Work in C.R.’s laboratory was funded by a grant from the Ministry of Science and 478
Innovation of Spain (BIO2009-07255). I.F.C. is recipient of a fellowship from the FPI Program of 479
the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. 480

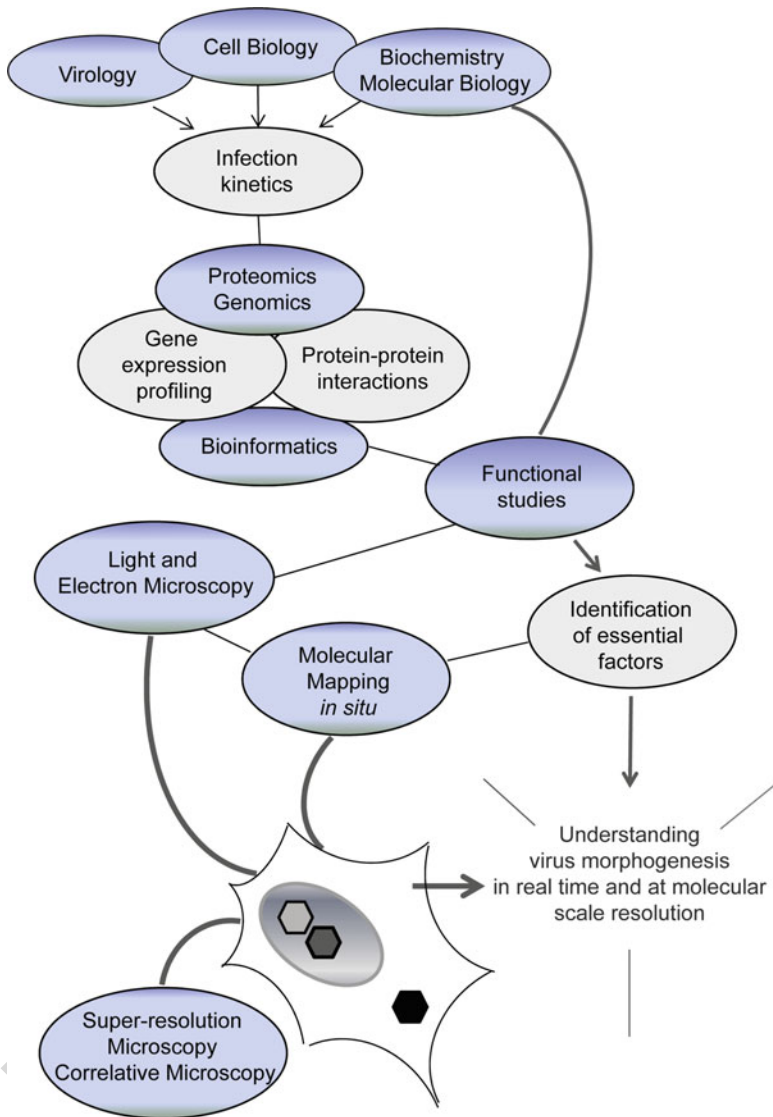


Fig. 14.8 Various technologies and their integration in the study of virus-cell interactions during viral morphogenesis. See text for a description

References and Further Reading

1. Novoa RR, Calderita G, Arranz R, Fontana J, Granzow H, Risco C (2005) Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol Cell* 97:147–172
2. Netherton CL, Wileman T (2011) Virus factories, double membrane vesicles and viroplasm generated in animal cells. *Curr Opin Virol* 1:381–387

3. Nagy PD, Pogany J (2010) Global genomics and proteomics to identify host factors as targets to induce resistance against *tomato bushy stunt virus*. *Adv Virus Res* 76:123–177 486 487
4. Alkhalil A, Hammamieh R, Hardick J, Ichou MA, Jett M, Ibrahim S (2010) Gene expression profiling of monkeypox virus-infected cells reveals novel interfaces for host-virus interactions. *Virol J* 7:173 488 489 490
5. Friedel CC, Haas J (2011) Virus-host interactomes and global models of virus-infected cells. *Trends Microbiol* 19:501–508 491 492
6. Sessions OM, Barrows NJ, Souza-Neto JA, Robinson TJ, Hershey CL, Rodgers MA, Ramirez JL, Dimopoulos G, Yang PL, Pearson JL, Garcia-Blanco MA (2009) Discovery of insect and human dengue virus host factors. *Nature* 458:1047–1050 493 494 495
7. Meliopoulos VA, Andersen LE, Birrer KF, Simpson KJ, Lowenthal JW, Bean AG, Stambas J, Stewart CR, Tompkins SM, van Beusechem VW, Fraser I, Mhlanga M, Barichievy S, Smith Q, Leake D, Karpilow J, Buck A, Jona G, Tripp RA (2012) Host gene targets for novel influenza therapies elucidated by high-throughput RNA interference screens. *FASEB J* 26:1372–1386 496 497 498 499
8. Pache L, König R, Chanda SK (2010) Identifying HIV-1 host cell factors by genome-scale RNAi screening. *Methods* 53:3–12 500 501
9. Morita E, Sandrin V, McCullough J, Katsuyama A, Hamilton IB, Sundquist WI (2011) ESCRT-III protein requirements for HIV-1 budding. *Cell Host Microbe* 9:235–242 502 503
10. MacFarlane SA, Uhrig JF (2008) Yeast two-hybrid assay to identify host-virus interactions. *Methods Mol Biol* 451:649–672 504 505
11. De Chasse B, Navratil V, Tafforeau L, Hiet MS, Aublin-Gex A, Agaugué S, Meiffren G, Pradezynski F, Faria BF, Chantier T, Le Breton M, Pellet J, Davoust N, Mangeot PE, Chaboud A, Penin F, Jacob Y, Vidalain PO, Vidal M, André P, Raourdin-Combe C, Lotteau V (2008) Hepatitis C virus infection protein network. *Mol Syst Biol* 4:230 506 507 508 509
12. Zhang L, Villa NY, Rahman MM, Smallwood S, Shattuck D, Neff C, Dufford M, Lanchbury JS, Labaer J, McFadden G (2009) Analysis of vaccinia virus-host protein-protein interactions: validations of yeast two-hybrid screenings. *J Proteome Res* 8:4311–4318 510 511 512
13. König R, Zhou Y, Elleder D, Diamond TL, Bonamy GM, Ireland JT, Chiang CY, Tu BP, De Jesus PD, Lilley CE, Seidel S, Opaluch AM, Caldwell JS, Weitzman MD, Kuhen KL, Bandyopadhyay S, Ideker T, Orth AP, Miraglia LJ, Bushman FD, Young JA, Chanda SK (2008) Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell* 135:49–60 513 514 515 516 517
14. Zhang B, Kraemer B, Sengupta D, Fields S, Wickens M (1999) Yeast three-hybrid system to detect and analyze interactions between RNA and protein. *Methods Enzymol* 306:93–113 518 519
15. Lee E-G, Linial ML (2004) Basic residues of the retroviral nucleocapsid play different roles in Gag-Gag and Gag-Z RNA interactions. *J Virol* 78:8486–8495 520 521
16. Jäger S, Gulbahce N, Cimermancic P, Kane J, He N, Chou S, D'Orso I, Fernandes J, Jan G, Frankel AD, Alber T, Zhou Q, Krogan NJ (2011) Purification and characterization of HIV-human protein complexes. *Methods* 53:13–19 522 523 524
17. Zhang F, Zang T, Wilson SJ, Johnson MC, Bieniasz PD (2011) Clathrin facilitates the morphogenesis of retrovirus particles. *PLoS Pathog* 7:e1002119 525 526
18. Barteel E, McCormack A, Früh K (2006) Quantitative membrane proteomics reveals new cellular targets of viral immune modulators. *PLoS Pathog* 2:e107 527 528
19. Martin-Serrano J, Neil SJD (2011) Host factors involved in retroviral budding and release. *Nat Rev Microbiol* 9:519–531 529 530
20. Kuhl BJ, Cheng V, Wainberg MA, Liang C (2011) Tetherin and its viral antagonists. *J Neuroimmune Pharmacol* 6:188–201 531 532
21. Gonzalez O, Zimmer R (2011) Contextual analysis of RNAi-based functional screens using interaction networks. *Bioinformatics* 27:2707–2713 533 534
22. Fontana J, López-Montero N, Elliott RM, Fernández JJ, Risco C (2008) The unique architecture of bunyamwera virus factories around the Golgi complex. *Cell Microbiol* 10:2012–2028 535 536

- 537 23. Katsafanas GC, Moss B (2007) Colocalization of transcription and translation within
538 cytoplasmic poxvirus factories coordinates viral expression and subjugates host functions.
539 Cell Host Microbe 2:221–228
- 540 24. Sivaraman D, Biswas P, Cella LN, Yates MV, Chen W (2011) Detecting RNA viruses in living
541 mammalian cells by fluorescence microscopy. Trends Biotech 29:307–313
- 542 25. Bozzola JJ, Russell LD (1999) Electron microscopy. Principles and techniques for biologists.
543 Jones and Bartlett Publishers, Inc, Boston
- 544 26. Goldsmith CS, Miller SE (2009) Modern uses of electron microscopy for detection of viruses.
545 Clin Microbiol Rev 22:552–563
- 546 27. Fiala JC (2005) Reconstruct: a free editor for serial section microscopy. J Microsc 218:52–61
- 547 28. Schatten H (2011) Low-voltage high-resolution SEM (LVHRSEM) for biological structural
548 and molecular analysis. Micron 42:175–185
- 549 29. Zauberman N, Mutsafi Y, Halevy DB, Shimoni E, Klein E, Xiao C, Sun S, Minsky A (2008)
550 Distinct DNA exit and packaging portals in the virus *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus.
551 PLoS Biol 6:e114
- 552 30. Risco C, Rodríguez JR, López-Iglesias C, Carrascosa JL, Esteban M, Rodríguez D (2002)
553 Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment membranes and vimentin filaments
554 participate in vaccinia virus assembly. J Virol 76:1839–1855
- 555 31. Briggs JAG, Kräusslich H-G (2011) The molecular architecture of HIV. J Mol Biol
556 410:491–500
- 557 32. Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CKE, Walther P, Fuller SD, Anthony C,
558 Krijnse-Locker J, Bartenschlager R (2009) Composition and three-dimensional architecture of
559 the dengue virus replication and assembly sites. Cell Host Microbe 5:365–375
- 560 33. Chlanda P, Carbajal MA, Cyrklaff M, Griffiths G, Krijnse-Locker J (2009) Membrane rupture
561 generates single open membrane sheets during vaccinia virus assembly. Cell Host Microbe
562 6:81–90
- 563 34. Cyrklaff M, Risco C, Fernández JJ, Jiménez MV, Esteban M, Baumeister W, Carrascosa JL
564 (2005) Cryo-electron tomography of vaccinia virus. Proc Natl Acad Sci USA 102:2772–2777
- 565 35. Kiernan JA (2008) Histological and histochemical methods. Theory and practice. Scion
566 Publishing Ltd, Oxfordshire
- 567 36. Hayat MA (2002) Microscopy, immunohistochemistry, and antigen retrieval methods. Kluwer
568 Academic/Plenum Publishers, New York
- 569 37. Van Weering JRT, Brown E, Sharp TH, Mantell J, Cullen PJ, Verkade P (2010) Intracellular
570 membrane traffic at high resolution. Methods Cell Biol 96:619–648
- 571 38. Tokuyasu KT (1973) A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. J Cell Biol
572 57:551–565
- 573 39. Slot JW, Geuze HJ (2007) Cryosectioning and immunolabeling. Nat Protoc 2:2480–2491
- 574 40. Sodeik B, Doms RW, Ericsson M, Hiller G, Machamer CE, van't Hof W, van Meer G, Moss B,
575 Griffiths G (1993) Assembly of vaccinia virus: role of the intermediate compartment between
576 the endoplasmic reticulum and the Golgi stacks. J Cell Biol 121:521–541
- 577 41. Jouvenet N, Simon SM, Bieniasz PD (2011) Visualizing HIV-1 assembly. J Mol Biol
578 410:501–511
- 579 42. Shu X, Lev-Ram V, Deerinck TJ, Qi Y, Ramko EB, Davidson MW, Jin Y, Ellisman MH, Tsien
580 RY (2011) A genetically encoded tag for correlated light and electron microscopy of intact
581 cells, tissues and organisms. PLoS Biol 9:e1001041
- 582 43. Gaietta G, Deerinck TJ, Admas SR, Bouwer J, Tour O, Laird DW, Sosinsky GE, Tsien RY,
583 Ellisman MH (2002) Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking.
584 Science 296:503–507
- 585 44. La Scola B, Desnues C, Pagnier I, Robert C, Barrasi L, Fournous G, Merchat M, Suzan-Monti
586 M, Forterre P, Koonin E, Raoul D (2008) The virophage as a unique parasite of the giant
587 mimivirus. Nature 455:100–104
- 588 45. Carvalho ZG, Alves de Matos AP, Rodrigues-Pousada C (1988) Association of African swine
589 fever virus with the cytoskeleton. Virus Res 11:175–192

46. Rojo G, Chamorro M, Salas ML, Viñuela E, Cuezva JM, Salas J (1998) Migration of mitochondria to viral assembly sites in African Swine fever virus-infected cells. *J Virol* 72:7583–7588
47. Pierini R, Cottam E, Roberts R, Wileman T (2009) Modulation of membrane traffic between endoplasmic reticulum, ERGIC and Golgi to generate compartments for the replication of bacteria and viruses. *Sem Cell Dev Biol* 20:828–833
48. Fontana J, Tzeng WP, Calderita G, Fraile-Ramos A, Frey TK, Risco C (2007) Novel replication complex architecture in rubella replicon-transfected cells. *Cell Microbiol* 9:875–890
49. Deng Y, Almshwerqi ZA, Ng MML, Kohlwein SD (2010) Do viruses subvert cholesterol homeostasis to induce host cubic membranes? *Trends Cell Biol* 20:371–379
50. Liu STH, Sharon-Friling RS, Ivanova P, Milne SB, Myers DS, Rabinowitz JD, Brown HA, Shenk T (2011) Synaptic vesicle-like lipidome of human cytomegalovirus virions reveals a role for SNARE machinery in virion egress. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:12869–12874
51. Harries P, Ding B (2011) Cellular factors in plant virus movement: at the leading edge of macromolecular trafficking in plants. *Virology* 411:237–243
52. Fontana J, López-Iglesias C, Tzeng WP, Frey TK, Fernández JJ, Risco C (2010) Three-dimensional structure of rubella virus factories. *Virology* 405:579–591
53. Ilkow CS, Weckbecker D, Cho WJ, Meier S, Beatch MD, Goping IS, Herrmann JM, Hobman TC (2010) The rubella virus capsid protein inhibits mitochondrial import. *J Virol* 84:119–130
54. Huang B, Babcock H, Zhuang X (2011) Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells. *Cell* 143:1047–1058
55. Jouvenet N, Zhadina M, Bieniasz PD, Simon SM (2011) Dynamics of ESCRT protein recruitment during retroviral assembly. *Nat Cell Biol* 13:394–401
56. Lehmann M, Rocha S, Mangeat B, Blanchet F, Uji-I H, Hofkens J, Piguet V (2011) Quantitative multicolor super-resolution microscopy reveals tetherin HIV-1 interaction. *PLoS Pathog* 7: e1002456
57. Monosov EZ, Wenzel TJ, Luers GH, Heyman JA, Subramani S (1996) Labeling of peroxisomes with green fluorescent protein in living *P. pastoris* cells. *J Histochem Cytochem* 44:581–589
58. Diestra E, Fontana J, Guichard P, Marco S, Risco C (2009) Visualization of proteins in intact cells with a clonable tag for electron microscopy. *J Struct Biol* 165:157–168
59. Wang Q, Mercogliano CP, Löwe J (2011) A ferritin-based label for cellular electron cryotomography. *Structure* 19:147–154
60. Risco C, Sanmartín-Conesa E, Tzeng WP, Frey TK, Seybold V, de Groot RJ (2012) Specific, sensitive, high-resolution detection of protein molecules in eukaryotic cells using metal-tagging transmission electron microscopy. *Structure* 20:759–766
61. Baumgärtel V, Ivanchenko S, Dupont A, Sergeev M, Wiseman PW, Kräusslich HG, Bräuchle C, Müller B, Lamb DC (2011) Live-cell visualization of dynamics of HIV budding site interactions with an ESCRT component. *Nat Cell Biol* 13:469–474

Further Reading

- Claverie JM, Abergel C (2009) Mimivirus and its viroplasm. *Annu Rev Genet* 43:49–66
- Erickson KD, Bouchet-Marquis C, Heiser K, Szomolanyi-Tsuda E, Mishra R, Lamothe B, Hoenger A, Garcea RL (2012) Virion assembly factories in the nucleus of polyomavirus-infected cells. *PLoS Pathog* 8:e100263
- Fogarty KH, Zhang W, Grigsby IF, Johnson JL, Chen Y, Mueller JD, Mansky LM (2011) New insights into HTLV-1 particle structure, assembly and Gag-Gag interactions in living cells. *Viruses* 3:770–793

- 637 Fu C, Johnson J (2011) Viral life cycles captured in three-dimensions with electron microscopy
638 tomography. *Curr Opin Virol* 1:125–133
- 639 Iwasaki K, Omura T (2010) Electron tomography of the supramolecular structure of virus-infected
640 cells. *Curr Opin Struct Biol* 20:632–639
- 641 Mutsafi Y, Zauberman N, Sabanay O, Minsky A (2010) Vaccinia-like cytoplasmic replication of
642 the giant mimivirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:5978–5982
- 643 Nagy PD, Pogany J (2012) The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors. *Nat*
644 *Rev Microbiol* 10:137–149
- 645 Otto A, Bernhardt J, Hecker M, Becher D (2012) Global relative and absolute quantitation in
646 microbial proteomics. *Curr Opin Microbiol* 15:1–9
- 647 Rust M, Lakadamyali M, Brandenburg B, Zhuang X (2008) Single-virus tracking in live cells. In:
648 Selvin PR, Ha T (eds) *Single molecule techniques: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor
649 Laboratory Press, New York
- 650 Van Vliet K, Mohamed MR, Zhang L, Villa NY, Werden SJ, Liu J, McFadden G (2009) Poxvirus
651 proteomics and virus-host protein interactions. *Microbiol Mol Biol Rev* 73:730–749

652 *Also especially recommended for further reading are references [1, 2, 3, 5, 19, 37, 49, 54]*
653 *listed above.*